

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

Estudio de los polimorfismos del gen VEGF en el cáncer de colon esporádico : valor pronóstico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Luisa Gutiérrez Menéndez

DIRECTORES:

María Luisa, dir Maestro de Las Casas
Marta, dir Vidaurreta Lázaro

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



616.348-006
215
105

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



627537614

**ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DEL
GEN VEGF EN EL CÁNCER DE COLON
ESPORÁDICO. VALOR PRONÓSTICO.**

TESIS DOCTORAL

MARÍA LUISA GUTIÉRREZ MENÉNDEZ

Directora: M^a Luisa Maestro de las Casas

Codirectora: Marta Vidaurreta Lázaro



140939546

Madrid, 2011

A mi abuelita y a mis padres

-Agradecimientos-

Desde que comencé mis estudios en biología quise realizar la tesis doctoral, a pesar de saber que requería una gran dedicación, esfuerzo, trabajo y estudio. He llegado a realizar y finalizar la tesis gracias a muchas personas que me han apoyado, ayudado y brindado esta oportunidad, por este motivo me gustaría dedicarles unas palabras.

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Marisa Maestro que me brindase esta oportunidad. Sin su dedicación, esfuerzo, apoyo, ánimo, cariño nunca hubiera podido comenzar y finalizar la tesis. También quiero agradecerle el recibimiento y la acogida en su grupo de investigación, desde el primer día me sentí como una más.

A mi codirectora de tesis, Marta Vidaurreta quiero expresarle mi agradecimiento por su paciencia, cariño, el ánimo, consejos, conocimientos, dedicación, esfuerzo que ha expresado durante todo este tiempo.

A Virginia, Sara, Silvia, Bea, Adela, Encarnita y Carmela por su cariño, apoyo y esfuerzo en la realización de esta tesis.

A la Dra. Cristina Fernández por haberme ayudado con las técnicas estadísticas, por su esfuerzo y dedicación.

Al Dr. Javier Cerdán por su dedicación y atención.

A todas las personas del Servicio de Análisis Clínicos que con su trabajo han hecho posible esta tesis.

No puedo dejar pasar la oportunidad de agradecer a mi familia todo su cariño, apoyo, amor..., por quererme como soy, en mis buenos y en mis malos momentos.

A mis padres gracias por apoyarme y estar siempre a mi lado. Sin vuestro ejemplo, dedicación, amor, comprensión, ánimo, consejos... nunca sería la persona que soy. Gracias por enseñarme tanto de la vida.

A mi abuelita por su amor incondicional, gracias por ser la mejor abuela.

A mi hermano Julio por su ejemplo, por sus consejos, su cariño.

A mi hermana Marta, gracias por cuidarme desde que era pequeña. Sin ti no habría llegado hasta aquí.

A mi hermano Ignacio, gracias por comprenderme tan bien, por ser mi apoyo.

A mi hermana Luz, por su cariño, por estar siempre a mi lado, por consolarme, por defenderme, por comprenderme tan bien, por su ejemplo de superación...

-ÍNDICES-

Y

-ABREVIATURAS-

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	1
I. EPIDEMIOLOGÍA	1
II. ETIOPATOGENIA	6
II.A. Formas de presentación del carcinoma colorrectal	6
A.1 Síndromes hereditarios asociados a CCR	7
1. Síndromes polipósicos	8
2. Síndromes no polipósicos	13
A.2 CCR esporádico	14
II.B. Factores de riesgo en el carcinoma colorrectal	15
III. ANATOMÍA PATOLÓGICA	23
III.A. Clasificación histopatológica	24
IV. SECUENCIA ADENOMA-CARCINOMA	31
V. BASES GENÉTICAS DE LA CARCINOGENESIS	33
COLORRECTAL	
V.A. Vía de la inestabilidad cromosómica	34
V.B. Vía de inestabilidad de microsatélites	42
VI. FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL	46
VII. EphB2	55
VIII. FACTORES PRONÓSTICO DEL CÁNCER COLORRECTAL	64
VIII.A. Factores pronóstico clínicos	65

A.1 Tipo histológico	65
A.2. Estadío tumoral	66
A.3. Grado de diferenciación celular	69
A.4. Localización del tumor primario	70
VIII.B. Factores pronóstico séricos	70
B.1. Lactato deshidrogenasa	70
B.2. Antígeno carcinoembrionario	71
B.3. CA19.9	72
VIII.C. Factores pronóstico celulares y tisulares	73
C.1. 18q/DCC	74
C.2. K-Ras	75
C.3. p53	76
C.4. Inestabilidad de los microsatélites	77
C.5. VEGF	78
C.6. EphB2	78
OBJETIVOS	81
Objetivos	83
PACIENTES Y MÉTODO	85
I. PACIENTES	87
II. MÉTODO	88
II.A. Metodología clínica	88
II.B. Metodología analítica	89

B.1 Extracción y cuantificación del ADN	89
B.2. Estudio de las alteraciones genéticas	91
1. Determinación de los polimorfismos del gen VEGF	91
2. Determinación de la mutación del gen EphB2	94
II.C. Metodología estadística	98
RESULTADOS	103
I. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN	105
II. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN VEGF	110
III. ESTUDIO DE DELECCIÓN EN LA REGIÓN 9A DEL GEN EphB2	113
IV. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN VEGF -2578 C/A, -1154 G/A Y + 936 C/T CON LOS FACTORES PRONÓSTICO CLÁSICOS	114
IV.A. Estudio de la relación del polimorfismo -2578 C/A del gen VEGF con los factores pronóstico clásicos	114
IV.B. Estudio de la relación del polimorfismo -1154 G/A del gen VEGF con los factores pronóstico clásicos	121
IV.C. Estudio de la relación del polimorfismo +936 C/T del gen VEGF con los factores pronóstico clásicos	128
V. ESTUDIO DEL HAPLOTIPO	138
VI. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE DELECCIÓN EN LA REGION 9 A DEL GEN EphB2 CON LOS FACTORES PRONÓSTICO CLÁSICOS	138
VII. EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE LOS PACIENTES CON	142

CARCINOMA COLORRECTAL ESPORÁDICO. ANÁLISIS DE LA
INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA GLOBAL

VII.A. Estudio de la supervivencia global	142
VII.B. Análisis univariante de la probabilidad acumulada de fallecer de los pacientes con cáncer colorrectal en relación con las variables clínico-patológicas y con los factores pronóstico clásicos	143
VII. C. Análisis univariante de la probabilidad acumulada de fallecer de los pacientes con CCR en relación con los polimorfismos del gen VEGF.	146
VII.D. Análisis univariante de la probabilidad acumulada de fallecer de los pacientes con CCR en relación con delección en la región 9A del gen EphB2	151
VII.E. Análisis estratificado de la supervivencia global	152
VII.F. Análisis multivariante de la supervivencia global	182
VIII. EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA COLORRECTAL ESPORÁDICO. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD	176
VIII.A. Estudio de la supervivencia libre de enfermedad	182
VIII.B. Análisis univariante de la probabilidad acumulada de recidivar en los pacientes con CCR en relación con las variables clínico-patológicas y con los factores pronóstico clásicos	184
VIII. C. Análisis univariante de la probabilidad acumulada de	186

recidivar en los pacientes con CCR en relación con los polimorfismos del gen VEGF.	
VIII.D. Análisis univariante de la probabilidad acumulada de recidivar en los pacientes con CCR en relación con delección en la región 9A del gen EphB2	191
VIII.E. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad	193
VIII.F. Análisis multivariante de la supervivencia libre de enfermedad	221
DISCUSIÓN	223
CONCLUSIONES	243
BIBLIOGRAFÍA	247

-ABREVIATURAS-

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AINES: Antiinflamatorios no esteroideos

AFAP: Poliposis Adenomatosa Familiar atenuada

ANOVA: Análisis de la Varianza

AJCC: Comité Americano de Cáncer

ASCO: Grupo Europeo de Marcadores Tumorales y la Sociedad Americana de Oncología Clínica

β FGF: Factor de crecimiento básico fibroblasto

CCR: Cáncer Colorrectal

CEA: Antígeno Carcinoembrionario

COX: Ciclo-Oxigenasa

DCC: Delección en el Cáncer de Colon

DE: Desviación estándar

EPIC: Estudio Prospectivo Europeo sobre Cáncer y Nutrición

FAP: Poliposis Familiar Adenomatosa

GTP: Guanosín Trifosfato

HIF: Factor inducible por hipoxia

HNPCC: CCR Hereditario No Polipósico

HR: Hazard Ratio

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer en el Mundo de la OMS

IC: Intervalo de Confianza

LDH: Lactato deshidrogenasa

LOH: Pérdida de heterocigosidad

MSI: Inestabilidad de Microsatélites

MSI-H: Inestabilidad de alto grado

MSI-L: Inestabilidad de bajo grado

MSS: Estabilidad microsatelital

OMS: Organización Mundial de la Salud

PD-ECGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PIGF: Factor de crecimiento placentario

PGI₂: Prostaciclina 2

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RR: Riesgo Relativo

SG: Supervivencia Global

SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad

SNPs: Sustituciones en una sola base de la secuencia de ADN

SPJ: Síndrome de Peutz-Jeghers

TAE: Tris-acetato EDTA

Tm: Temperatura de fusión

TGF β : Factor de crecimiento de transformación β

VEGF: Factor de Crecimiento Vascular Endotelial

VEGFR: Receptores del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura del colon	23
Figura 2. Adenomas colónicos.	28
a. Adenoma tubular. b. Adenoma túbulo-veloso. c. Adenoma veloso	
Figura 3. Secuencia adenoma-carcinoma con las alteraciones genéticas	32
Figura 4. Estructura de la proteína APC	35
Figura 5. Vía de señalización Wnt	36
Figura 6. Estructura de la proteína p53	37
Figura 7. Funciones de p53 y estímulos de p53	38
Figura8. Estructura de la proteína DCC	39
Figura 9. Funciones de k-ras	41
Figura 10. Proteína k-ras 10	41
Figura 11. Vía VEGF	52
Figura 12. Señalización Eph-efrinas	55
Figura 13. Subdivisiones de la categoría T de la clasificación TNM	67
Figura 14. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con cáncer colorrectal. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)	143
Figura 15. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con cáncer colorrectal según el estadio tumoral. Serie de 345 pacientes	145

diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)

Figura 16. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con 145
cáncer colorrectal según el grado de diferenciación tumoral. Serie de 345
pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San
Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)

Figura 17. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con 152
cáncer colorrectal según la delección en la región 9A del gen EphB2. Serie de
323 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San
Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)

Figura 18. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con 181
adenocarcinoma colorrectal según presencia de delección en la región 9A del
gen EphB2. Serie de 323 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal.
Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)

Figura 19. Curva de supervivencia libre de enfermedad acumulada de los 183
pacientes con cáncer colorrectal. Serie de 345 pacientes diagnosticados de
carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-
Noviembre 2009)

Figura 20. Curva de supervivencia libre de enfermedad acumulada de los 186
pacientes con cáncer colorrectal según el estadio tumoral. Serie de 345
pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San
Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)

Figura 21. Curva de supervivencia libre de enfermedad acumulada de los 192
pacientes con cáncer colorrectal según la presencia de delección en la región
9A del gen EphB2. Serie de 323 pacientes diagnosticados de carcinoma
colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre
2009)

Figura 22. Curva de supervivencia libre de enfermedad acumulada de los 221
pacientes con adenocarcinoma colorrectal según la presencia de delección en
la región 9A del gen EphB2. Serie de 323 pacientes diagnosticados de
carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-
Noviembre 2009)

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1. Incidencia del cáncer en Europa	4
Gráfico 2. Mortalidad por cáncer en Europa	4
Gráfico 3. Causas de muerte en España en el año 2006	5
Gráfico 4. Incidencia del cáncer en España en 2006 en hombres	5
Gráfico 5. Incidencia del cáncer en España en 2006 en mujeres	5
Gráfico 6. Distribución de tumores colorrectales según localización. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)	107
Gráfico 7. Distribución de tumores colorrectales según tipo histológico. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)	107
Gráfico 8. Distribución de tumores colorrectales según la clasificación de Dukes. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)	108
Gráfico 9. Distribución de tumores colorrectales según la clasificación de Grinnell de grado de diferenciación. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)	109
Gráfico 10. Distribución de tumores colorrectales según el tipo de cirugía. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital	110

Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)

Gráfico 11. Distribución de tumores colorrectales según el genotipo del polimorfismo VEGF -2578 C/A. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009) 111

Gráfico 12. Distribución de tumores colorrectales según el genotipo del polimorfismo VEGF -1154 G/A. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009) 111

Gráfico 13. Distribución de tumores colorrectales según el genotipo del polimorfismo VEGF +936 C/T. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009) 112

Gráfico 14. Distribución de tumores colorrectales según presencia de delección en la región 9A del gen EphB2. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009) 113

Gráfico 15. Distribución del alelo C del polimorfismo VEGF -2578 C/A según la edad de la población. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009) 119

Gráfico 16. Distribución del polimorfismo VEGF +936 C/T en función del sexo. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. 132

Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)

Gráfico 17. Distribución del polimorfismo VEGF +936 C/T según el estadio 132

de Dukes. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal.

Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)

Gráfico 18. Distribución del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T en 137

función del sexo. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma

colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre

2009)

Gráfico 19. Distribución del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T 137

según el estadio de Dukes. Serie de 342 pacientes diagnosticados de

carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-

Noviembre 2009)

Gráfico 20. Distribución de delección en la región 9A del gen EphB2 según 141

la localización del tumor. Serie de 323 pacientes diagnosticados de carcinoma

colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre

2009)

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Síndromes hereditarios asociados a carcinoma colorrectal	7
Tabla 2. Factores de riesgo de cáncer colorrectal	15
Tabla 3. Clasificación de los pólipos colorrectales	25
Tabla 4. Clasificación histológica de los tumores colorrectales	30
Tabla 5. Oligonucleótidos repetidos de las secuencias MSI consenso	44
Tabla 6. Miembros de la familia VEGF	50
Tabla 7. Clasificación de los factores pronóstico	65
Tabla 8. Clasificación Dukes	66
Tabla 9. Clasificación de Astler-Coller	66
Tabla 10. Clasificación TNM	68
Tabla 11. Relación entre estadios de las clasificaciones TNM, Astler-Coller y Dukes	68
Tabla 12. Secuencias de cebadores y sondas del polimorfismo -2578 C/A	91
Tabla 13. Secuencias de cebadores y sondas del polimorfismo -1154 G/A	91
Tabla 14. Secuencias de cebadores y sondas del polimorfismo +936 C/T	92
Tabla 15. Secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación de la secuencia que contiene la región 9 A del gen EphB2 mediante PCR.	94
Tabla 16. Prevalencia del polimorfismo VEGF -2578 C/A en relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San	116

Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009). * Sólo se ha podido estudiar en 307 pacientes.

Tabla 17. Prevalencia del alelo C del polimorfismo VEGF -2578 C/A en 118
relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico
clásicos. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal.
Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009). *
Sólo se ha podido estudiar en 307 pacientes.

Tabla 18. Prevalencia del alelo A del polimorfismo VEGF -2578 C/A en 121
relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico
clásicos. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal.
Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009). *
Sólo se ha determinado en 307 pacientes.

Tabla 19. Prevalencia del polimorfismo VEGF -1154 G/A en relación con 124
las variables clínico patológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de
341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San
Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009). * Sólo se determinó en
306 pacientes

Tabla 20. Prevalencia del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A en 126
relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico
clásicos. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal.
Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009). *
Sólo se determinó en 306 pacientes.

Tabla 21. Prevalencia del alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A en relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009). * Sólo se determinó en 306 pacientes	128
Tabla 22. Prevalencia del polimorfismo VEGF +936 C/T en relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009). * Sólo se pudo determinar en 307 pacientes	131
Tabla 23. Prevalencia del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T en relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009). * Sólo se determinó en 307 pacientes	134
Tabla 24. Prevalencia del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T en relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009). * Sólo se ha determinado en 307 pacientes	136
Tabla 25. Prevalencia de delección en la Región 9A del gen EphB2 en relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de 323 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal.	140

Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

Tabla 26. Características clínicas de los 10 tumores portadores de delección en la región 9A del gen EphB2 141

Tabla 27. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con las variables clínico-patológicas. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009) 144

Tabla 28. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con el polimorfismo VEGF -2578 C/A. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009) 146

Tabla 29. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con el alelo C del polimorfismo VEGF -2578 C/A. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009) 147

Tabla 30. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con el alelo A del polimorfismo VEGF -2578 C/A. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009) 147

Tabla 31. Análisis univariante de la supervivencia global en relación el polimorfismo VEGF -1154 G/A. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009) 148

Tabla 32. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con el alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009)	148
Tabla 33. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con el alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009)	149
Tabla 34. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con el polimorfismo VEGF +936 C/T. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009)	149
Tabla 35. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con el alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009)	150
Tabla 36. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con el alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009)	150
Tabla 37. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con delección en la región 9A del gen EphB2. Serie de 323 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de	151

Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009)

Tabla 38. Análisis estratificado de la supervivencia global en el estudio del polimorfismo VEGF -2578 C/A. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009) 155

Tabla 39. Análisis estratificado de la supervivencia global en relación con el alelo C del polimorfismo VEGF -2578 C/A. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009) 158

Tabla 40. Análisis estratificado de la supervivencia global en relación con el alelo A del polimorfismo VEGF -2578 C/A. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009) 161

Tabla 41. Análisis estratificado de la supervivencia global en el estudio del polimorfismo VEGF -1154 G/A. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009) 163

Tabla 42. Análisis estratificado de la supervivencia global en relación con el alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009) 167

Tabla 43. Análisis estratificado de la supervivencia global en relación con el alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A. Serie de 341 pacientes 170

diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009)

Tabla 44. Análisis estratificado de la supervivencia global en el estudio del polimorfismo VEGF + 936 C/T. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009) 172

Tabla 45. Análisis estratificado de la supervivencia global en relación con el alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009) 176

Tabla 46. Análisis estratificado de la supervivencia global en relación con el alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009) 179

Tabla 47. Análisis estratificado de la supervivencia global en el estudio de delección en la región 9A del gen Ephb2. Serie de 323 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009) 180

Tabla 48. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con las variables clínico-patológicas y factores pronóstico clásicos de los pacientes con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009). 185

Tabla 49. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el polimorfismo VEGF -2578 C/A de los pacientes con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).	187
Tabla 50. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el alelo C del polimorfismo VEGF -2578 C/A de los pacientes con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).	187
Tabla 51. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el alelo A del polimorfismo VEGF -2578 C/A de los pacientes con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).	188
Tabla 52. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el polimorfismo VEGF -1154 G/A de los pacientes con CCR. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).	188
Tabla 53. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A de los pacientes con CCR. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).	189
Tabla 54. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A de los pacientes con CCR. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal.	189

Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

Tabla 55. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el polimorfismo VEGF +936 C/T de los pacientes con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009). 190

Tabla 56. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T de los pacientes con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009). 190

Tabla 57. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T de los pacientes con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009). 191

Tabla 58. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con presencia de delección en la región 9A del gen EphB2. Serie de 323 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009) 191

Tabla 59. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en el estudio del polimorfismo VEGF -2578 C/A. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009) 195

Tabla 60. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el alelo A del polimorfismo VEGF -2578 C/A de los pacientes 198

con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal.
Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009)

Tabla 61. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en 201
relación con el alelo C del polimorfismo VEGF -2578 C/A de los pacientes
con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal.
Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009)

Tabla 62. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en 203
el estudio del polimorfismo VEGF -1154 G/A. Serie de 341 pacientes
diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de
Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009)

Tabla 63. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en 207
relación con el alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A de los pacientes
con CCR. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal.
Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009)

Tabla 64. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en 210
relación con el alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A de los pacientes
con CCR. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal.
Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009)

Tabla 65. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en 212
el estudio del polimorfismo VEGF +936 C/T. Serie de 342 pacientes
diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de
Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009)

Tabla 66. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en 216

relación con el alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T de los pacientes con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009)

Tabla 67. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en 219

relación con el alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T de los pacientes con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009)

Tabla 68. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en 220

el estudio de delección en la región 9A del gen Ephb2. Serie de 323 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009)

-INTRODUCCIÓN-

I. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer es un problema de salud pública. Uno de cada tres hombres y una de cada cuatro mujeres padecerán cáncer. Es la segunda causa de muerte en los países desarrollados y la tercera en los países en vías de desarrollo, provoca el 12,6% de todas las muertes, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ¹.

En el año 2002 se estima que se diagnosticaron 10,9 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo, fue la causa de 6,7 millones de muertes y 24,6 millones de personas lo padecían, según datos de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer en el Mundo de la OMS (IARC) ². Actualmente el cáncer de pulmón es el que presenta mayor incidencia (1,35 millones de nuevos casos fueron diagnosticados en el 2002) y además es la primera causa de muerte por cáncer (en el 2002 causó 1,18 millones de muertes). El segundo en incidencia es el cáncer de mama con 1,15 millones de nuevos casos en el 2002 y 410.000 muertes, siendo el cáncer de mayor prevalencia. El tercer lugar lo ocupa el cáncer colorrectal (CCR) con 1 millón de nuevos casos en el 2002 y causante de 598.000 muertes en el mismo año ².

En los países desarrollados y según la localización del tumor, en los hombres el cáncer que presenta mayor incidencia es el de próstata, seguido del cáncer de pulmón y del colorrectal. En términos de mortalidad el cáncer que provoca mayor número de muertes es el de pulmón, en segundo lugar es el CCR seguido del de próstata. Sin embargo en las mujeres el cáncer de mama es el de mayor incidencia, seguido del CCR

y del cáncer de pulmón. Respecto a la mortalidad el cáncer de mama es la causa de mayor número de muertes, seguido del cáncer de pulmón y a continuación sería el CCR².

En Europa en el año 2006 se estimó que se diagnosticaron 3.191.600 casos y que el cáncer causó la muerte de 1.703.000 personas. Teniendo en cuenta ambos sexos, las neoplasias más frecuentes son el cáncer de mama (429.900 casos, 13,5% de todos los casos), seguido del CCR (412.900, 12,9%) y el de pulmón (386.300, 12,1%) (Gráfico 1). El cáncer de pulmón con una estimación de 334.800 muertes (19,7% del total) es la causa más frecuente de muerte por cáncer, seguido del CCR con 207.400 muertes (12,2% del total de muertes) y el de mama con 131.900 (7,8%) (Gráfico 2). Considerando sexos separados, en los hombres la principal causa de muerte por cáncer es el de pulmón con 253.300 muertes (26,6%), seguido por el CCR con 107.600 muertes (11,3%), el tercer lugar lo ocupa el de próstata con 87.400 (9,2%). En las mujeres europeas el cáncer causante de más fallecimientos es el de mama con 131.900 muertes (17,6%), el CCR con 99.900 muertes anuales (13,3%) ocupa el segundo lugar y el de pulmón con 81.500 muertes (10,9%) el tercer lugar³.

En España la incidencia es de 162.000 casos anuales. El cáncer es la segunda causa de muerte en nuestro país (Gráfico 3). Respecto a los demás países de la Unión Europea, España ocupa una situación intermedia en mortalidad por cáncer en los hombres (con una disminución del 1,3% anual) y una de las tasas más bajas en las mujeres (con una disminución del 1% anual). En el año 2006 el cáncer causó 98.046 muertes en hombres y 36.862 en las mujeres. Los cánceres más frecuentes en los

españoles son el de próstata, seguido del pulmón y del CCR (Gráfico 4). En las españolas el más frecuente es el de cáncer de mama, seguido del colorrectal, el de útero y el de pulmón (Gráfico 5). En España, en términos globales el CCR es el tumor que presenta mayor incidencia (25.600 casos anuales); seguido del cáncer de pulmón (18.800 nuevos casos), mama (16.000 nuevos casos) y próstata (13.300 nuevos casos) ^{4,5}.

El CCR es el cuarto cáncer más común en hombres y el tercero en mujeres.⁵ En el 2002 se diagnosticaron 1.023.000 nuevos casos y causó 529.000 muertes en el mundo. Es la tercera causa de muerte por cáncer en los países de Europa Occidental y en Estados Unidos⁵. La mayor incidencia se encuentra en Norte América, Australia, Europa Occidental; África y América del sur presentan una baja incidencia ².

En Europa el CCR representa el 13% de todos los nuevos casos de cáncer y el 11,9% de muertes por cáncer. En el 2004 se estimó una incidencia de 377.000 nuevos casos. Teniendo en cuenta ambos sexos es el segundo cáncer más frecuente y la segunda causa de muerte. En el 2004 se diagnosticaron 197.000 nuevos casos en varones con una tasa de mortalidad del 50,7% y en las mujeres se diagnosticaron 179.000 nuevos casos con una tasa de mortalidad de 49,3% ⁸.

Se espera que una dieta menos calórica y un aumento en el ejercicio físico causen una disminución en la incidencia y mortalidad. El cribado del CCR es una gran herramienta para este objetivo².

España sigue en general la misma tendencia que el resto de Europa en cuanto a aumento en la incidencia y de la supervivencia en los últimos años ⁹. En el 2002 se estimó una incidencia de 22.000 nuevos casos. Considerando ambos sexos es el cáncer con mayor incidencia y causa 10.800 muertes (49%). Al contrario que en EEUU la mayoría de los países europeos, incluida España, presentan una incidencia al alza, tanto en incidencia como en mortalidad. El progresivo envejecimiento de la población influye en esta tendencia⁸.

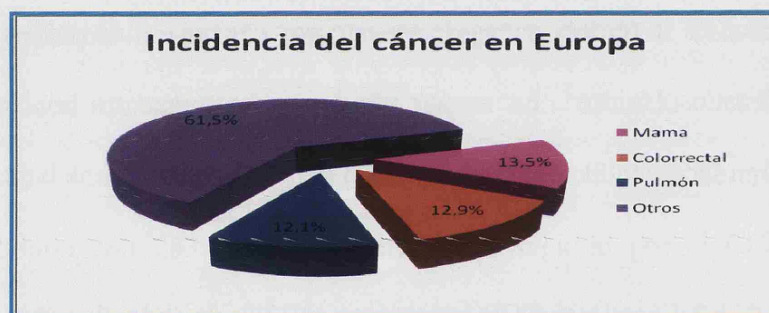


Gráfico 1. Incidencia del cáncer en Europa



Gráfico 2. Mortalidad por cáncer en Europa

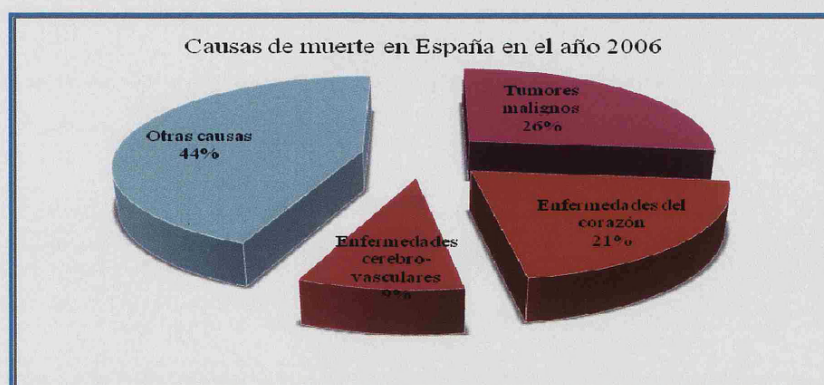


Gráfico 3. Causas de muerte en España en el año 2006

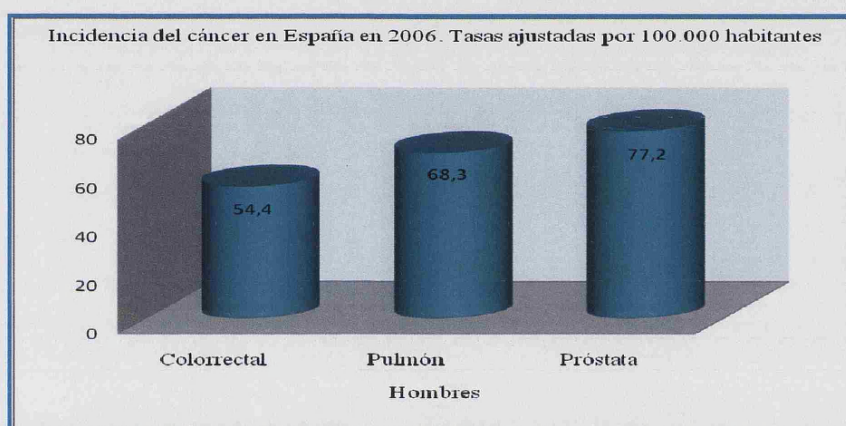


Gráfico 4. Incidencia del cáncer en España en 2006 en hombres

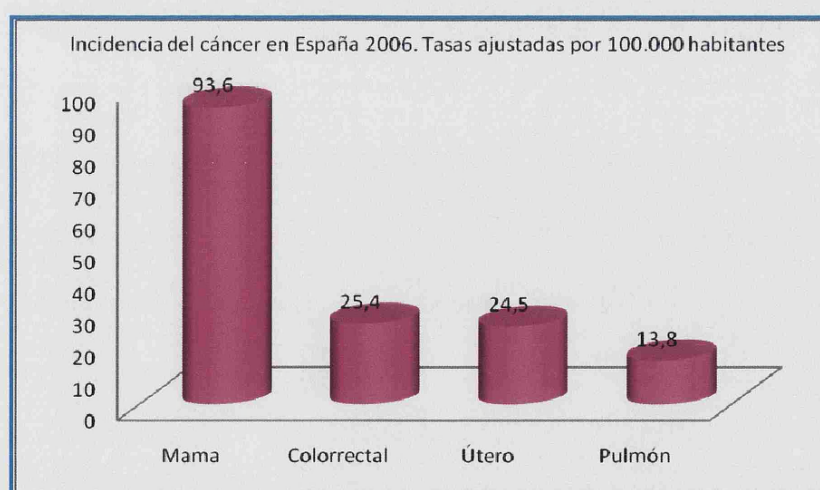


Gráfico 5. Incidencia del cáncer en España en 2006 en mujeres

II. ETIOPATOGENIA

Múltiples evidencias apoyan la participación de factores tanto genéticos como ambientales en la patogenia del CCR.

II.A. Formas de presentación del carcinoma colorrectal

Alrededor del 80% de los CCR surgen espontáneamente en la población, el otro 20% aparece en pacientes que tienen una historia familiar de CCR. Es decir se pueden clasificar como esporádicos, familiares o hereditarios. Estos datos hacen pensar que en el proceso de la cancerogenesis colorrectal hay una base genética, una exposición común a factores ambientales o una combinación de ambos.

Los síndromes familiares suponen algo menos del 10% del total de los CCR ¹⁰. Su estudio es importante, porque son consecuencia de la presencia de mutaciones en la línea germinal de genes supresores y porque nos ayudará a comprender las bases moleculares del cáncer (tanto colorrectal como de los demás tumores), al diagnóstico, a un mejor estadiaje, al pronóstico, a su prevención y a plantear nuevas estrategias terapéuticas.

Los CCR los clasificamos en hereditarios o esporádicos.

A.1 Síndromes hereditarios asociados a CCR

Podemos clasificar a los síndromes hereditarios que predisponen al desarrollo de un tumor colorrectal en dos grupos: aquellos que se caracterizan por la formación de pólipos y aquellos que no forman pólipos o forman muy pocos. (Tabla 1). Los más frecuentes son la poliposis familiar adenomatosa (FAP) y el CCR hereditario no polipósico (HNPCC).

1. SÍNDROMES POLIPÓSICOS
1.1. Poliposis adenomatosas
1.1.1. Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP) 1.1.2. Poliposis Adenomatosa Familiar atenuada 1.1.3. Síndrome de Turcot 1.1.4. Síndrome de Gardner 1.1.5. Poliposis MYH
1.2. Poliposis hamartomatosas
1.1.1. Síndrome de Peutz-Jeghers 1.1.2. Poliposis juvenil 1.1.3. Enfermedad de Cowden
2. SÍNDROMES NO POLIPÓSICOS
1.1. Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipósico (HNPCC) 1.2. Síndrome de Muir- Torre

Tabla 1. Síndromes hereditarios asociados a carcinoma colorrectal

1. SÍNDROMES POLIPÓSICOS

Los síndromes polipósicos son trastornos autosómicos dominantes que tienen una predisposición a la transformación maligna. De todos los CCR el 1% es debido a estos síndromes ¹¹.

1.1. Poliposis adenomatosas

Se caracterizan por la presencia de numerosos pólipos adenomatosos en todo el colon, además de otras manifestaciones extracolónicas.

1.1.1. Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP)

Es una enfermedad hereditaria autosómica dominante con alta penetrancia ¹². Es el síndrome polipósico más frecuente, tiene una incidencia de 1/10.000 a 1/30.000 personas ¹³. Explica menos del 1% de todos los CCR ¹⁵.

Para la mayoría de los profesionales es una entidad clínica diagnosticada por la presencia de más de cien pólipos adenomatosos con o sin historia familiar de la enfermedad. Estos pólipos comienzan a desarrollarse en la adolescencia hasta la tercera década de la vida.

Es una enfermedad con un alto grado de malignización ya que los pólipos adenomatosos pueden progresar hacia un carcinoma. Sin una colectomía profiláctica el riesgo de progresión de los pólipos hacia CCR es casi del 100% a los 40 años de edad ¹⁵.

La FAP también tiene manifestaciones extracolónicas: hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina, tumores desmoides.

Es una enfermedad monogénica causada por mutaciones o delecciones en el gen supresor APC localizado en el cromosoma 5q21^{16, 17}. Este gen contiene 15 exones (el exón 15 es el que sufre más mutaciones), codifica para la proteína APC que regula a la β -catenina. La ausencia de APC permite la entrada de la β -catenina al núcleo, ésta activa la expresión de genes estimuladores de la proliferación celular.

Algunas mutaciones se correlacionan con las manifestaciones fenotípicas. Se sabe que las mutaciones germinales localizadas entre el codón 450-1600 son las causantes de que el paciente tenga más de 100 pólipos¹⁸. Las mutaciones entre los codones 457 y 1444 causan hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina¹⁹.

Se cree que la proteína APC está implicada en el inicio de la tumorigenesis del CCR ya que se ha encontrado que el 80% de los CCR esporádicos tienen mutaciones en dicho gen¹⁵.

1.1.2. Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada (AFAP)

Este síndrome se caracteriza por la presencia de numerosos pólipos adenomatosos (generalmente menos de 50) con una tendencia hacia el recto¹⁷. La adenomatosis se desarrolla entre los 35-45 años.

Es causado por mutaciones en el gen supresor APC (normalmente en los extremos codificantes 5' y 3'), sin embargo tiene menos penetrancia de cáncer de colon y menos manifestaciones extracolónicas que la FAP, al igual que la FAP son frecuentes los adenomas gástricos y duodenales¹⁹.

Mutaciones en el gen MYH pueden ser las responsables de esta enfermedad¹⁷.

1.1.3. Síndrome de Turcot

Este síndrome se caracteriza por el desarrollo de pólipos adenomatosos y una alta incidencia de tumores del sistema nervioso central (meduloblastoma, glioma o glioblastoma). Entre los 20 y 30 años es la edad media de desarrollo de los pólipos. Entre los 10 y 15 años siguientes se desarrolla el cáncer.

Las familias que tienen meduloblastoma tienen una anomalía en el gen APC, sin embargo las familias que sufren glioblastomas tienen mutaciones en los genes reparadores hMLH1, hMSH2 y hPMS2 ²⁰.

1.1.4. Síndrome de Gardner

Este síndrome se manifiesta por la presencia difusa de pólipos adenomatosos en el tracto gastrointestinal, tumoraciones de tejidos blandos y osteomas múltiples (sobre todo en el cráneo, mandíbula, huesos largos), quistes epidermoides y fibromatosis. Con mayor frecuencia de lo habitual presenta cáncer duodenal y tiroideo. Muchos autores coinciden en la creencia de que el Síndrome de Gardner y la FAP son variantes de un mismo síndrome, la penetrancia de una mutación común explicaría el mayor número de alteraciones observadas en el Síndrome de Gardner.

1.1.5. Poliposis MYH

Es un síndrome de herencia autosómica recesiva. Los pacientes desarrollan más de 15 pólipos adenomatosos y no muestran evidencias de FAP o AFAP ²¹.

Es causado por mutaciones en el gen reparador MYH localizado en el cromosoma 1p33-34 ²².

1.2. Poliposis Hamartomatosas

Los síndromes de poliposis hamartomatosas son un grupo de enfermedades infrecuentes. Suponen el 1% de todos los CCR ⁹. Los pacientes desarrollan los pólipos hamartomatosos a una edad temprana. Estos pólipos se consideraron previamente no neoplásicos, sin embargo, en la actualidad se reconoce que tienen una predisposición hacia las malignidades intestinales ²³.

1.2.1. Síndrome de Peutz-Jeghers (SPJ)

Es un trastorno de aparición temprana, de herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta y fenotipo variable ²⁴. Su incidencia es de 1/200.000 personas ²⁵.

Se caracteriza por la presencia de múltiples pólipos gastrointestinales adenomatosos y hamartomatosos que se hallan distribuidos por todo el tracto digestivo, desde el estómago hasta el recto, aunque suelen ser más abundantes en el intestino delgado. En labios, zona perioral y bucal pueden desarrollarse múltiples máculas melanocíticas.

Mutaciones en el gen supresor LKB1o STK1 localizado en el cromosoma 19p predisponen a este síndrome. Es un gen supresor que codifica a una serina/treonina quinasa ^{13, 25}. Actualmente hay una evidencia de que estos pacientes tienen una predisposición a malignidades tanto gastrointestinales como extraintestinales (mama, ovario, cérvix, tiroides, pulmón, próstata). Estudios recientes demuestran que el 50-90% de pacientes con SPJ desarrollaran cáncer (40% CCR, 30-60% gástrico, 0,5-33% esófago, 15-30% intestino delgado y el 35% cáncer pancreático) ²³.

1.2.2. Poliposis juvenil

Síndrome hereditario autosómico dominante. Se presenta en la infancia. Su incidencia es de 1/100.000 individuos ²⁶.

Se caracteriza por la presencia de varios pólipos hamartomatosos, por lo menos 3 pero se pueden desarrollar al mismo tiempo varios centenares. Se localizan en la región colorrectal pero también pueden formarse en el intestino delgado y en el estómago. Estos pólipos los desarrollarán durante toda la vida no sucede lo mismo en los pacientes con pólipos juveniles esporádicos ¹¹.

Este síndrome es causado por mutaciones en los genes supresores SMAD4/DPC4 localizado en el cromosoma 18q21 o en el gen BMPR1A/ALK3 situado en el cromosoma 10q21-22 ^{27, 28}. También puede estar causado por mutaciones en el gen PTEN situado en el cromosoma 10 ²⁹.

Se estima un riesgo de CCR del 30% al 50% y del 10% en cáncer gastrointestinal superior ³⁰.

1.2.3. Enfermedad de Cowden

Es un síndrome de poliposis hereditario autosómico dominante caracterizado por la presencia de múltiples pólipos hamartomatosos en piel y mucosas. Su incidencia es de 1/200.000 individuos ²¹.

Estos pólipos no suelen progresar a malignidad sin embargo la enfermedad de Cowden se asocia con relativa frecuencia a cáncer de tiroides (10%), cáncer de mama y enfermedad fibroquística (10-50%) ³¹. A pesar de que los pacientes con enfermedad de Cowden desarrollan pólipos hamartomatosos, todavía no hay una clara evidencia de si la enfermedad de Cowden aumenta el riesgo de desarrollar CCR ³².

Mutaciones en el gen PTEN son las causantes de este síndrome³³.

2. SÍNDROMES NO POLIPÓSICOS

2.1. Cáncer Colorrectal Hereditario no Polipósico (HNPCC)

Descrito por Henry Lynch (1974), y redefinido por consenso (Vasen y otros 1991, 1999). El HNPCC o síndrome de Lynch explican del 1 al 5% de todos los CCR.

Es un síndrome autosómico dominante con una penetrancia del 80%¹⁴ y una predisposición a cáncer de colon con riesgo de CCR del 80%²¹. El CCR se desarrolla a edades tempranas (media de 45 años de edad). A menudo las neoplasias del colon se localizan en el colon proximal (el 70%), pueden ser múltiples (18% sincrónicos y 24% metacrónicos) y no siempre se asocian a adenomas preexistentes³⁴. Se caracteriza por la presencia de unos pocos pólipos pero aparecen considerablemente antes que en el resto de la población adulta (30-40 años de edad) y progresan más rápido a CCR.

Además presenta predisposición a neoplasias extraintestinales: carcinoma de estómago, ovario, uréter y pelvis renal, los conductos biliares, riñón, intestino delgado, tumores cerebrales, además en la mujer es frecuente el cáncer de endometrio (con un riesgo del 60%)³⁵.

El HNPCC se divide en base a la presencia o ausencia de manifestaciones extracolónicas en Síndrome de Lynch I (se caracteriza por el desarrollo de CCR con predominio en el colon proximal) y Síndrome de Lynch II (presenta tumores extracolónicos además de las características del Síndrome Lynch I)

Tres genes del sistema de reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN) se han asociado a HNPCC: el gen hMLH1 situado en el cromosoma 3; el gen hMSH2

localizado en el cromosoma 2; el gen hMSH6 ³⁶. Actualmente se está estudiando la implicación de otros genes reparadores: PMS1, PMS2, y MSH3 ³⁷. Las mutaciones en estos genes causan el fenómeno conocido como inestabilidad de microsatélites (MSI).

La heterogenicidad de HNPCC complica su diagnóstico. Los antecedentes familiares tienen un papel fundamental en su identificación. El *International Collaborative Group on HNPCC* elaboró los criterios que definen al HNPCC y que permiten diferenciar la agregación familiar del CCR del patrón hereditario. Según los criterios de Amsterdam I (Vasen et al 1991) debe cumplir los siguientes criterios: la persona afectada es un familiar de primer grado de dos personas afectas; miembros afectados de al menos dos generaciones sucesivas; por lo menos un enfermo de CCR deben ser diagnosticado antes de la edad de 50 años y se debe excluir FAP. La última revisión de estos criterios, conocida como Amsterdam II, incorpora la importancia de los cánceres extracolónicos ³⁸.

2.2. Síndrome de Muir- Torre

Es una variante poco frecuente del HNPCC. Estos pacientes presentan neoplasia cutánea sebácea y un riesgo de cáncer de mama mayor que el resto de la población³⁹.

A.2. CCR esporádico

El CCR esporádico es una enfermedad heterogénea, desde el punto de vista molecular, de su historia natural, distribución o de la patología de las lesiones precursoras o invasivas ⁴⁰.

Los cánceres colorrectales esporádicos experimentan cambios moleculares y genéticos diversos durante la tumorigenesis, como por ejemplo en el en el gen APC, en el sistema reparador del ADN, en el gen p53^{40,41}.

II.B. Factores de riesgo en el carcinoma colorrectal

Es importante conocer y entender el proceso de la tumorigenesis. Sabemos que el CCR es la consecuencia de una serie de hechos que se inician con una mutación o un proceso similar al que le siguen fenómenos de progresión. En estos procesos están implicados tanto factores genéticos como factores ambientales. Estos factores de riesgo pueden ser clasificados en modificables y no modificables (Tabla 2).

La forma de vida de las sociedades occidentales es un factor de riesgo ya que se relaciona directamente con un alto consumo de grasa de carne animal, con un bajo consumo en verduras, frutas y fibra y con la falta de ejercicio físico³⁹.

MODIFICABLES	NO MODIFICABLES
Obesidad	Edad
Ejercicio físico	Historia personal o familiar de CCR
Tabaco	Enfermedad inflamatoria intestinal
Alcohol	
Grasas	
Proteínas	
Fibra	
Fármacos	

Tabla 2. Factores de riesgo de cáncer colorrectal

1. Obesidad

Estudios prospectivos han demostrado que las personas obesas tienen riesgo de desarrollar CCR 1,5 veces mayor que las personas con un índice de masa corporal normal ⁴².

2. Ejercicio físico

Los estudios demuestran que las personas que realizan ejercicio físico habitualmente tienen menor riesgo de CCR ⁴³. En un meta-análisis de 52 estudios se concluyó que las personas que practicaban algún deporte tenían un 24% de riesgo menor de CCR (riesgo relativo (RR) = 0,76; intervalo de confianza (IC) al 95%= 0,72 - 0,81) ⁴⁴.

3. Tabaco

El hábito de fumar se ha asociado con un aumento de la incidencia y mortalidad por CCR. En un meta-análisis de 106 estudios observacionales se estimó que el riesgo de CCR era mayor en los fumadores que en los no fumadores (RR= 1.18, 95% IC 1.11- 1.25) ⁴⁵.

4. Alcohol

Varios estudios han sugerido que el consumo de alcohol podría estar asociado a un ligero incremento en el riesgo de padecer CCR, lo cual ha sido más evidente con el consumo de cerveza y en los pacientes en los cuales el consumo de alcohol se asocia al hábito de fumar ^{46, 47}.

La ingesta del alcohol (de más de 30 g/día) se asocia con un riesgo levemente creciente de cáncer rectal y se asocia principalmente a la cerveza y al vino ⁴⁸.

Se piensa que el alcohol interfiere con el ácido fólico disponible ⁴⁹ y que causa un aumento de la proliferación celular de la mucosa ⁵⁰.

5. Grasas

Algunos estudios epidemiológicos han hallado una correlación positiva entre la incidencia de carcinoma colorrectal y el consumo de carne. En general, este aumento en el consumo de grasa de origen animal suele acompañarse de un descenso en el consumo de fibra vegetal, otro de los factores involucrados en el proceso de carcinogenesis colónica.

6. Proteínas

La carne roja y procesada aumenta perceptiblemente el riesgo de CCR, sin embargo el pescado tiene un papel protector ⁵¹.

7. Fibra

La importancia de la fibra vegetal radica en su capacidad para fijar los ácidos biliares y diversos carcinógenos en la luz del intestino. Además tiene efectos modificadores de la flora fecal y aceleradores del tránsito intestinal, lo cual disminuye la concentración intraluminal de sustancias carcinogénicas o cocarcinogénicas, además de acortar el tiempo de contacto de éstas con la mucosa colónica.

En el Estudio Prospectivo Europeo sobre Cáncer y Nutrición (EPIC) se ha confirmado que dietas ricas en fibra producen un efecto protector ⁵². Dentro de este

estudio se analizaron 1.065 casos incidentes de cáncer de colon y recto, se observó una reducción del 42 % en la probabilidad de tener este tumor (RR= 0,58; IC 95% = 0,41-0,85). El efecto se observó en toda clase de fibras tanto provenientes de cereales, como de vegetales y frutas. Es decir que una dieta rica en fruta y verduras tiene un efecto protector sobre el riesgo de CCR ⁵².

Sin embargo hay estudios contradictorios. Algunos estudios no encuentran relación entre la ingesta de fibra y el riesgo de CCR ⁵³. Además en dos estudios aleatorios en EEUU se observó que el suplemento de fibra tenía un efecto protector no significativo para el desarrollo de CCR recurrente ⁵⁴.

8. Fármacos

El riesgo de CCR puede ser disminuido por la aspirina u otro fármaco antiinflamatorio no esteroideo y por terapia de reemplazo hormonal. Sin embargo en la actualidad no se recomiendan para prevenir el CCR debido a sus efectos secundarios ⁵⁵.

a. Terapia de reemplazo hormonal

En los últimos 20 años la mortalidad del CCR ha disminuido levemente en hombres pero mucho más en las mujeres. Esta diferencia se explica por el uso cada vez mayor de los estrógenos posmenopáusicos es decir por la terapia de reemplazo hormonal ⁵⁶.

Los mecanismos mediante los que puede prevenir el CCR son: por una disminución de la producción de ácidos biliares secundarios, por la disminución de la producción de insulina, actuando directamente sobre el epitelio colorrectal o por una combinación de ambos ⁵⁷.

En el “*Cancer Prevention Study II*” encontraron una disminución significativa de la mortalidad del cáncer de colon con el uso de la terapia de reemplazo hormonal (RR= 0,71); además el efecto era mayor tanto en las mujeres que estaban actualmente en terapia (RR=0,55) como en aquellas que habían recibido la terapia durante 11 años (RR= 0,54) ⁵⁸.

Estas observaciones y el mecanismo de acción de estrógenos sugieren que los estrógenos actúan probablemente en los estados avanzados de la carcinogenesis colorrectal ⁵⁹.

b. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Estos fármacos inhiben la ciclo-oxigenasa I (COX-1) y la ciclo-oxigenasa 2 (COX-2), enzimas implicadas en la síntesis de las prostaglandinas.

La COX-1 se expresa en muchos tejidos. Sin embargo la COX-2 es inducida por factores de crecimiento, mitógenos y citoquinas. En el epitelio del colon de las personas sanas la COX-2 no se expresa pero si lo hace en el 90% de los CCR, por este motivo se han hecho estudios preclínicos en los que con el uso de AINEs se observó una disminución del número de adenomas y carcinomas. Aunque aun no se ha aclarado cuál es el mecanismo, se piensa que puede ser debido a la regulación de la angiogenesis y/o a un aumento de la apoptosis ⁵⁹.

9. Edad

La edad representa un grado medio de riesgo. Antes de los 40 años el riesgo de padecer CCR en personas sin predisposición para esta neoplasia es bajo. Después de los 40 años el riesgo aumenta progresivamente, duplicándose la incidencia con cada década

y alcanzando un pico entre los 75 y 80 años de edad. En grupos de elevado riesgo es alta la posibilidad de desarrollar cáncer en edades más tempranas. Las personas de elevado riesgo son aquellas que tienen adenomas colorrectales, enfermedad inflamatoria crónica del intestino, síndromes de poliposis familiar, antecedentes familiares de CCR, historia de cáncer o adenoma colorrectal previo (la resección de una neoplasia colónica previa entraña un riesgo suplementario de padecer una segunda neoplasia).

10. Antecedentes personales o familiares de CCR

Los CCR extirpados se convierten en metacrónicos en el 1,5-3 % de los pacientes en los cinco primeros años tras la colectomía.

El riesgo es de 1,7% para aquellas personas que tengan un familiar de primer grado afectado.

11. Enfermedad inflamatoria intestinal

a. Colitis ulcerosa

Se define como la inflamación de la mucosa del colon; el recto está casi siempre afectado, la inflamación se extiende en dirección proximal y con extensión variable. La afectación es continua, es decir no existen áreas sanas en la zona afectada.

Varios estudios demuestran que los pacientes con colitis ulcerosa tienen un mayor riesgo de CCR que el resto de la población. La incidencia global de cáncer colónico como complicación de una colitis ulcerosa es del 0,7%. Las estenosis constituyen el lugar selectivo para su asentamiento, predominando la neoplasia en el

recto, el colon descendente y el transverso. Suele corresponder a un adenocarcinoma infiltrativo y en el 15-20% de los casos es multicéntrico ⁶⁰⁻⁶⁴.

En un estudio realizado por Lakatos et al se observó que cuanto más prolongado era el tiempo de evolución de la colitis ulcerosa, mayor era la incidencia de CCR. Así los pacientes que tenían la enfermedad desde hacía 10 años tenían un riesgo de 0,6%, los que la padecían desde hace 20 años tenían un riesgo de 5,4% y el riesgo era de 7,5% después de 30 años de enfermedad ⁶⁵.

En un estudio realizado con más de 3.000 pacientes de colitis ulcerosa se concluyó que el riesgo de CCR era 1,9 veces mayor en la proctitis que en la población normal y era 14,8 veces superior en los pacientes con pancolitis que en la población sana ⁶⁶.

Lakatos et al también observan que los pacientes con colitis ulcerosa con mayor extensión tenían más riesgo de CCR que aquellos con una afectación menor de colitis ulcerosa (RR= 1,76; IC 95% = 1,01-3,07). Otros investigadores han observado lo mismo por eso se cree que la extensión de la colitis ulcerosa puede ser un factor de riesgo independiente para CCR ⁶⁰.

En resumen son factores de riesgo la afectación pancolónica, el inicio de la enfermedad en la infancia o la adolescencia, el curso de tipo crónico-continuo y una duración superior a 10 años.

b. Enfermedad de Crohn

Los pacientes con enfermedad de Crohn tienen un riesgo 3 a 5 veces superior al de la población general de presentar neoplasia intestinal. Los factores de riesgo son

idénticos a los de la colitis ulcerosa, además de los trayectos fistulosos y las intervenciones de cortocircuito intestinal.

Von Roon et al realizaron un estudio con 16.848 pacientes de Crohn, ellos concluyeron que el RR de desarrollar CCR en esos pacientes era de 2,44 (IC 95%= 1,56-3,82). Observaron que los pacientes con menor edad tenían mayor riesgo de desarrollar CCR. Dividieron su población de estudio en función de la extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico y concluyeron que los pacientes con enfermedad de Crohn localizada en el intestino delgado tenían un RR de 0,85 (IC 95%= 0,08-7,49), en aquellos en que la enfermedad se localizaba en el íleon tenían un RR de 4,63 (IC 95%= 2,09-10,26), aquellos pacientes con Crohn localizado en el colon tenían un RR de 13,36 (IC 95%= 5,71-31,26) ⁶⁸.

Otros estudios también demuestran que los pacientes con enfermedad de Crohn tienen mayor riesgo de desarrollar CCR que la población sana ⁶⁹.

III. ANATOMÍA PATOLÓGICA

El colon humano mide alrededor de 1,5 m de longitud, su calibre disminuye progresivamente desde el ciego hasta el colon sigmoide.

Su pared consta de cuatro capas: serosa, muscular, submucosa y mucosa. (Figura 1).

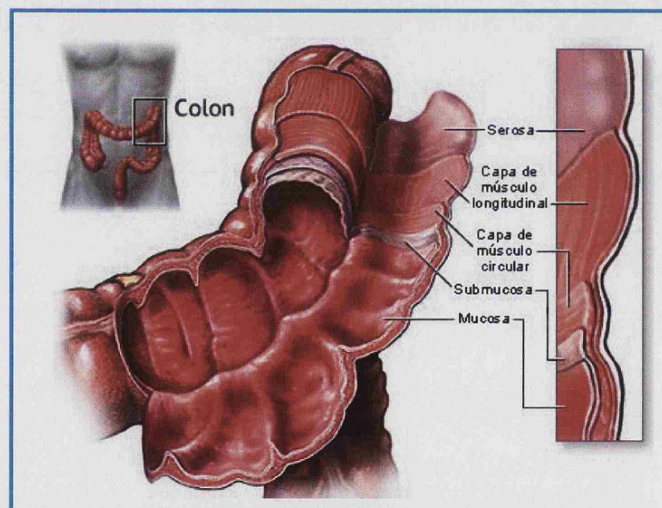


Figura 1. Estructura del colon

La mucosa del intestino grueso está formada por tres capas muscularis mucosae, lámina propia y epitelio cilíndrico. Este epitelio forma criptas pero no posee vellosidades. La superficie externa del colon hace una prominencia hacia fuera formando unas bolsas o haustras.

La capacidad regenerativa del epitelio es notable. La renovación epitelial tiene lugar en las criptas como una serie de acontecimientos coordinados: proliferación, diferenciación y migración luminal. Permiten sustituir a las células superficiales que se pierden por envejecimiento y abrasión superficial. La zona replicativa se sitúa en la mitad inferior de las criptas. Las células indiferenciadas dan lugar a células progenitoras que son capaces de diferenciarse hacia todos los linajes epiteliales, se diferenciarán y migrarán a la superficie plana de la mucosa de la cripta ⁷⁰. Cuando alcanzan la superficie sufren apoptosis ⁷¹. El recambio del epitelio de la superficie dura de 4 a 6 días ⁷². Las células con el ADN dañado no sufren apoptosis, llegan a la superficie de la cripta y continúan la proliferación. Cuando esto sucede estamos en un estado precanceroso ⁷³. La rápida renovación del epitelio intestinal hace que su capacidad de reparación sea notable, pero también permite que el intestino sea especialmente vulnerable a los agentes que interfieren en la replicación celular, como son la radiación y la quimioterapia antineoplásica.

En los estadios iniciales de la carcinogenesis colorrectal las células epiteliales serán incapaces de reprimir la replicación del ADN durante su migración a la superficie de la cripta desarrollando una mayor capacidad de proliferación.

III.A. Clasificación histopatológica

1. Pólipos

Es una proliferación de células de la mucosa que sobresalen hacia la luz del intestino grueso. Estas células pueden generar subclones con nuevas mutaciones provocando un aumento de la tasa de crecimiento. La mayoría de los pólipos son

benignos y asintomáticos sin embargo algunos son neoplásicos (tabla 3). Actualmente se ha demostrado que la mayoría de los CCR provienen de pólipos adenomatosos ⁷⁴.

Hay tres tipos de adenomas: tubulares, tubulovelloso y vellosos.

PÓLIPOS NO NEOPLÁSICOS	PÓLIPOS NEOPLÁSICOS
Pólipo hiperplásico	Benigno
Pólipo hamartomatoso	Adenoma tubular
Pólipo inflamatorio	Adenoma túbulo-velloso
Pólipo linfoide	Adenoma velloso
	Maligno
	Carcinoma

Tabla 3. Clasificación de los pólipos colorrectales

1.1. Pólipos no neoplásicos

Estos pólipos no tienen potencial de malignización. El 90% de todos los pólipos del intestino grueso son no neoplásicos. Suelen ser esporádicos. Su frecuencia aumenta con la edad, se encuentran en más de la mitad de las personas mayores de 60 años. Se desarrollan como consecuencia de una inflamación, de alteraciones de la maduración o de alteraciones de la arquitectura de la mucosa.

1.1.1. Pólipos hiperplásicos

Los pólipos hiperplásicos son lesiones de la mucosa típicamente pequeñas (<5 milímetro en diámetro), sésiles o levemente aumentadas ⁷⁵. El epitelio está formado por una capa de células sin muestras de displasia. Desde el punto de vista histológico estas

lesiones están formadas por glándulas y criptas. Estas lesiones son más frecuentes en el recto y colon sigmoide y su número aumenta con la edad. Son lesiones benignas carentes de cualquier potencial de malignidad ⁷⁴.

Se desarrollan entre la quinta y sexta década de vida, mientras que los adenomas se presentan generalmente en la sexta y séptima década ⁷⁶.

En pacientes con poliposis hiperplásica se ha observado una asociación con la malignidad. Aun no se conocen las bases genéticas de esta enfermedad. Los pacientes tienen grandes y múltiples pólipos hiperplásicos distribuidos por el colon y el recto. Los investigadores creen que la lesión precursora podría ser un adenoma que coexiste con estos pólipos o que los pólipos hiperplásicos grandes podrían tener un potencial displásico ^{77, 78}.

Estos pólipos hiperplásicos contienen cambios genéticos iguales a los observados en el CCR, como son las mutaciones en el gen K-ras o la MSI ⁷⁹. Esta transición está asociada a alteraciones moleculares adquiridas que probablemente supongan pasos importantes en el desarrollo del tumor. Una célula tiene que sufrir 5 alteraciones moleculares importantes para que evolucione clonalmente a carcinoma ⁸⁰. Las deleciones cromosómicas específicas son especialmente significativas porque causan pérdida de los genes supresores. Los pasos más importantes son las alteraciones en los genes APC (cromosoma 5), DCC (delección en el cáncer de colon) (18q), p53 (17p), la mutación del oncogen K-ras y las pérdidas cromosómicas asociadas con la inestabilidad cromosómica y molecular. Las mutaciones adquiridas o heredadas de los genes que se encargan de reparar los daños del ADN juegan un papel importante en la predisposición a las mutaciones en las células colorrectales. No todos los tumores necesitan adquirir todas las mutaciones ni tampoco es necesario que ocurran en un

orden específico pero el tipo de mutación puede influir en el tipo o tasa de cambio patológico de los tumores a carcinoma ⁸⁰.

1.1.2. Pólipos hamartomatosos

Se desarrollan tanto en niños como en adultos. Se suelen localizar en la región rectosigmoide y suelen ser pedunculados. El tamaño varía desde unos milímetros a varios centímetros. Desde el punto de vista histológico los pólipos hamartomatosos están formados por músculo liso, lámina propia y glándulas ⁷².

1.1.3. Pólipo inflamatorio

Son lesiones típicamente pequeñas y múltiples. Corresponden a zonas de mucosa inflamada y en regeneración, rodeadas de ulceraciones. Están formadas por tejido granuloso junto con la mucosa inflamada ⁸¹. Es la consecuencia de un estímulo inflamatorio crónico que sufre un paciente con enfermedad inflamatoria de larga evolución (enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa).

1.1.4. Pólipo linfoide

Son una variante de la mucosa normal que posee abundantes agregados de tejido linfoide intramucoso. Pueden encontrarse en enfermedades infecciosas o enfermedades inflamatorias intestinales. Una posible complicación es la ulceración superficial. Su aspecto puede ser similar al de adenomas sésiles, por tanto para su correcto diagnóstico es necesario un estudio histológico ⁷².

1.2. Pólipos neoplásicos

1.2.1. Benignos

Los pólipos adenomatosos son benignos, se deben a la proliferación displásica del epitelio, pueden tener distintos grados de displasia, lo que le confiere el significado de lesión premaligna. Además de una proliferación epitelial también proliferan las glándulas en las que se asienta este epitelio y lo hacen en forma de túbulos o vellosidades (papilas). La edad del paciente y el tamaño del pólipo son factores de riesgo para esta transformación ⁸².

Se distinguen tres tipos histológicos de adenomas según el patrón predominante de crecimiento de las glándulas en forma de túbulos, vellosidades (proyecciones digitiformes finas de la lámina propia revestidas por el epitelio displásico) o mixto (figura 2). En los tres tipos puede haber grados comparables de displasia. El riesgo de degeneración de los adenomas vellosos es aproximadamente del 40%, el de los adenomas tubulares del 5%, y el de los adenomas mixtos o túbulo-vellosos del 22%. El riesgo de malignización es alto cuando existen múltiples adenomas y cuando el tamaño del adenoma es superior a 1 cm.

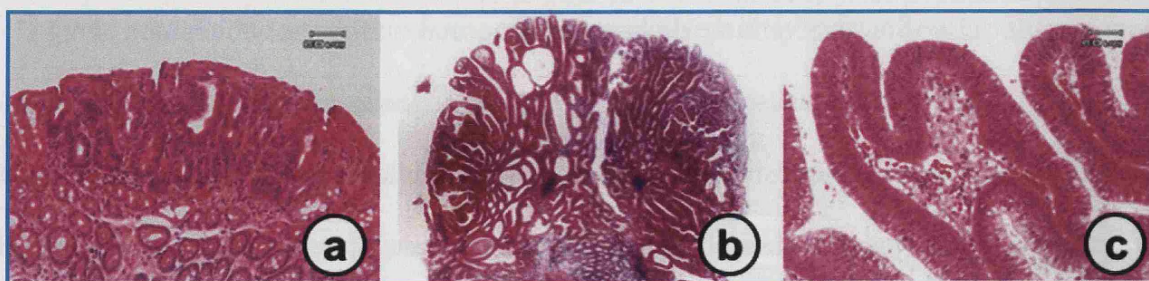


Figura 2. Adenomas colónicos. a. Adenoma tubular. b. Adenoma túbulo-velloso. c. Adenoma velloso

1.2.1.1. Adenoma tubular

Los más pequeños tienen un contorno liso y son sésiles, los mayores tienden a mostrar lóbulos y tallos delgados. No suelen tener diámetros mayores de 2,5 cm. El tallo está formado por tejido fibromuscular y vasos sanguíneos prominentes, una mucosa intestinal no neoplásica lo recubre. El epitelio adenomatoso se puede extender al tallo. Las lesiones adenomatosas están formadas por epitelio neoplásico con glándulas revestidas por células altas, hipercromáticas, algo desordenadas y pueden contener vacuolas de mucina.

1.2.1.2. Adenoma vellosa

Son pólipos epiteliales de mayor tamaño, el diámetro suele ser de 10 cm. Son más frecuentes en el recto y rectosigma. Son masas aterciopeladas en forma de coliflor que se proyectan por encima de la mucosa normal adyacente. Desde el punto de vista histológico son extensiones vellosas y frondosas de la mucosa cubiertas por epitelio cilíndrico displásico desordenado.

1.2.1.3. Adenoma tubulovelloso o mixto

Desde el punto de vista de displasia y tamaño ocupan un lugar intermedio entre los adenomas tubulares y los vellosos.

1.2.2. Carcinoma

Los tumores del intestino grueso se dividen en dos grupos: tumores epiteliales y tumores mesenquimales (tabla 4).

TUMORES EPITELIALES	TUMORES MESENQUIMALES
Adenocarcinoma	Linfoma
Adenocarcinoma mucinoso o coloide	Leiomioma
Adenocarcinoma en anillo de sello	Hemangiosarcoma
Carcinoma simple	Sarcoma de Kaposi
	Fibrosarcoma
	Melanoma

Tabla 4. Clasificación histológica de los tumores colorrectales

Más del 95% de los CCR son carcinomas, de éstos alrededor de un 95% son adenocarcinomas ⁷².

El 10-20% son adenocarcinomas mucinosos, la mucina se puede acumular en las células tumorales o en el lumen glandular.

El adenocarcinoma en anillo de sello supone el 1% de todos los CCR ^{83,84}. Recibe este nombre porque el núcleo está desplazado hacia un lado debido a la producción de mucina intracelular.

IV. SECUENCIA ADENOMA-CARCINOMA

La progresión de adenoma a cáncer es la vía más común y está causada por la acumulación de mutaciones en las células del colon ^{85,86}. La mayoría de los cánceres de colon se desarrollan a partir de pólipos adenomatosos. La hipótesis de Vogelstein (también llamada teoría de la carcinogenesis colónica) sugiere una progresión ordenada desde una mucosa normal a mucosa hiperproliferativa, a pólipos pequeños con pequeño potencial maligno, a pólipos más grandes con displasia, a células transformadas pero no invasivas que constituyen el carcinoma in situ, a tumores invasivos pero no metastáticos y, finalmente, a tumores metastáticos. En este proceso, las células que se transforman se irían cargando de alteraciones moleculares ¹⁰.

Hay evidencias que apoyan la teoría de la secuencia adenoma-carcinoma sin embargo no quiere decir que todos los adenomas se conviertan en carcinomas ni tampoco excluye la carcinogenesis de “novo”, ya que hay CCR sin signos de precursores adenomatosos, ésto indica que algunas lesiones displásicas pueden degenerar a malignas sin pasar por el estadio de pólipo ⁷². No obstante hay una gran evidencia de que los adenomas son las lesiones precursoras de los carcinomas colorrectales:

1. Las poblaciones con una alta prevalencia de adenomas tienen una alta prevalencia de CCR y viceversa.
2. La distribución de los adenomas en el colon y recto es similar a la del CCR (se suelen localizar en la región rectosigmoide) ^{87,88}. La incidencia máxima de los

pólipos adenomatosos precede en unos cinco años al pico de incidencia del CCR

88.

3. Cuando se identifican carcinomas infiltrantes en estadio precoz suele encontrarse tejido adenomatoso a su alrededor.
4. El riesgo de cáncer es directamente proporcional al número de adenomas.
5. Estos dos tipos de lesiones tienen los mismos factores de riesgo ambientales ⁸⁹,
⁹⁰. Tanto los adenomas como el CCR pueden mostrar alteraciones moleculares similares ^{91, 92}.

Se han definido los pasos genéticos que median entre el pólipo, la displasia, el carcinoma in situ y el cáncer invasor, comprenden los siguientes: mutación puntual del protooncogen K-ras, hipometilación del ADN que facilita la expresión del gen, pérdida alélica en el gen APC (supresor de tumores), pérdida alélica del gen DCC situado en el cromosoma 18 y pérdida y mutación del gen p53 situado en el cromosoma 17. El CCR es el resultado de estas alteraciones genéticas pero no tiene porque seguir siempre el mismo orden ⁹³.

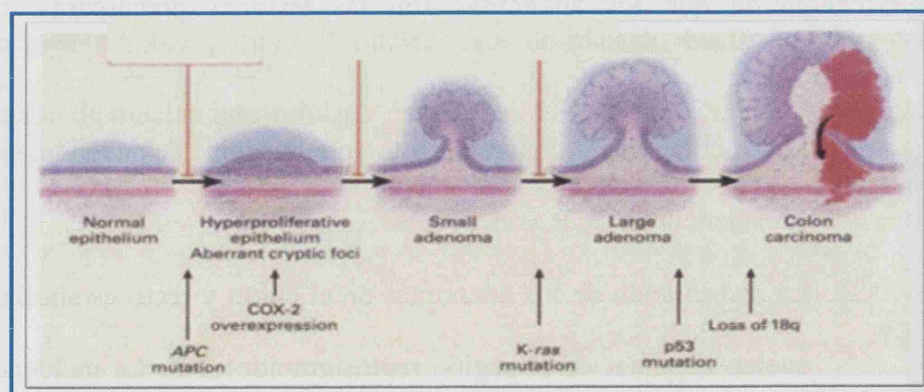


Figura 3. Secuencia adenoma-carcinoma con las alteraciones genéticas

V. BASES GENÉTICAS DE LA CARCINOGENESIS COLORRECTAL

Desde que en 1990 Fearon y Vogelstein propusieran el modelo genético de la tumorigenesis del CCR se ha avanzado en su entendimiento y desde este punto de vista es una de las malignidades mejor conocidas. Ellos introdujeron un modelo de carcinogenesis de CCR que consiste en múltiples pasos genéticos que se corresponden con progresión histológica desde el epitelio colónico normal a una displasia adenomatosa a través de la microinvasión, adenocarcinoma y finalmente metástasis ⁹⁴. Más del 90% de los carcinomas contienen dos o más alteraciones genéticas sin embargo sólo el 7% de los adenomas tienen esas alteraciones. Actualmente se aceptan dos vías en la secuencia de adenoma a carcinoma: la vía de la inestabilidad cromosómica y la vía de la MSI.

En la vía de la inestabilidad cromosómica están implicados oncogenes y genes supresores. Se caracteriza por la pérdida o ganancia de regiones cromosómicas o cromosomas enteros. Los genes supresores que juegan un papel mayor son: el gen APC localizado en el cromosoma 5q (descubierto por Delattre et al ⁹⁵); en el cromosoma 17p la proteína tumoral p53 (Fearon y Vogelstein ⁹³) y el gen DCC situado en el cromosoma 18q (Gervaz ⁹⁶). Las alteraciones en estos genes provocan la inactivación genética de funciones que aumentan la probabilidad de que tenga lugar la carcinogenesis. El oncogen más importante en esta vía es el K-ras ⁹⁷. La ausencia de la proteína APC normal impide la señalización inhibitoria del crecimiento normal permitiendo el desarrollo de un adenoma temprano. En el adenoma, la mutación somática de K-ras permite la extensión clónica y el crecimiento del adenoma. La

pérdida del brazo corto del cromosoma 18 se asocia con la extensión de un adenoma grande con displasia. Después de estas etapas, una mutación en p53 le conferirá la capacidad de invadir a través de la membrana basal es decir se convertirá en un carcinoma⁹⁴.

La vía de MSI induce el 15% de los CCR^{98,99}. Thibodeau et al, Peltomaki et al y Aaltonen et al publicaron los primeros artículos sobre MSI en el año 1993¹⁰⁰. Durante la replicación la ADN polimerasa puede cometer errores, sin embargo estos son corregidos por el sistema de reparación del ADN¹⁰¹. La deficiencia en el mecanismo de reparación provoca la MSI y permite la acumulación de mutaciones en cada división celular facilitando la transformación tumoral^{102, 103}.

V.A. Vía de la inestabilidad cromosómica

A.1. Gen APC

Es un gen supresor localizado en el cromosoma 5q. Sus mutaciones son responsables de la FAP, AFAP, además de encontrarse alterado en el 80% de los adenomas y adenocarcinomas^{104, 105}. Las alteraciones son tanto genéticas como epigenéticas^{106, 107}. Codifica a la proteína APC de 32kDa. (Figura 4).

Las anomalías genéticas más tempranas en la progresión del CCR son las mutaciones en este gen y en un gran número de casos son la lesión principal. Este gen contiene 8535 pb y 21 exones¹⁰⁸. El exón 15 es el que sufre más mutaciones y corresponde al 75% de la secuencia codificante del gen. Estas mutaciones se encuentran en los adenomas más pequeños con mayor frecuencia que alteraciones en el gen K-ras

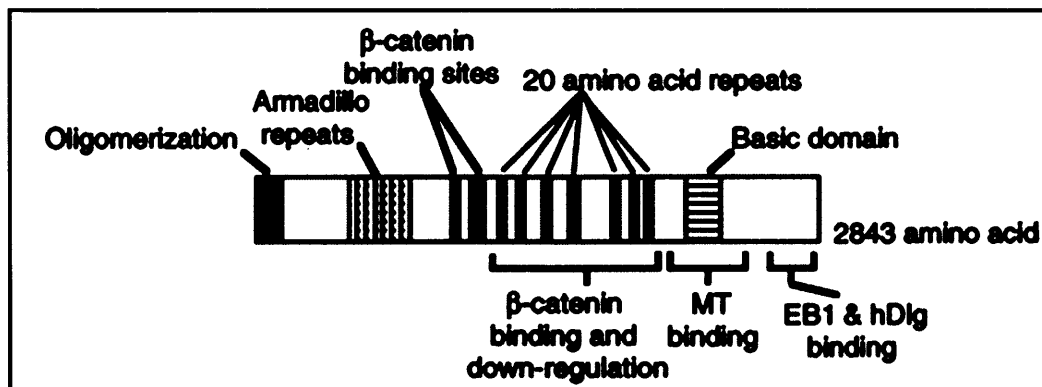
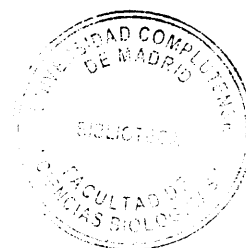


Figura 4. Estructura de la proteína APC

Su función está relacionada con las señales celulares, la adhesión intercelular o con ambas. Forma parte del mecanismo de señalización Wnt, su función en esta vía es regular a la β -catenina. Además tiene un papel en la organización del citoesqueleto, apoptosis, control del ciclo celular y adhesión celular^{109, 110}. (Figura 5).

Su mutación produce una proteína APC truncada, se piensa que esto permite una transcripción sin regulación de oncogenes como c-myc y ciclina D1, es decir promueve la tumorigenesis^{111, 112}. La mayoría de las proteínas truncadas carecen de su extremo carboxi-terminal que es la secuencia de unión con los microtúbulos¹¹³.

La función de la proteína APC en la vía de traducción de señales de Wnt es degradar a la β -catenina^{114, 115}. La ausencia de APC o una proteína anormal permite a la β -catenina la entrada en el núcleo donde se une a factores de transcripción (por ejemplo Tcf4) activando la expresión de genes estimuladores de la proliferación celular (como c-myc o ciclina D1)¹¹⁶. La vía de señalización de Wnt es crítica en el proceso del desarrollo, se ha demostrado que promueve la carcinogenesis¹¹⁷.



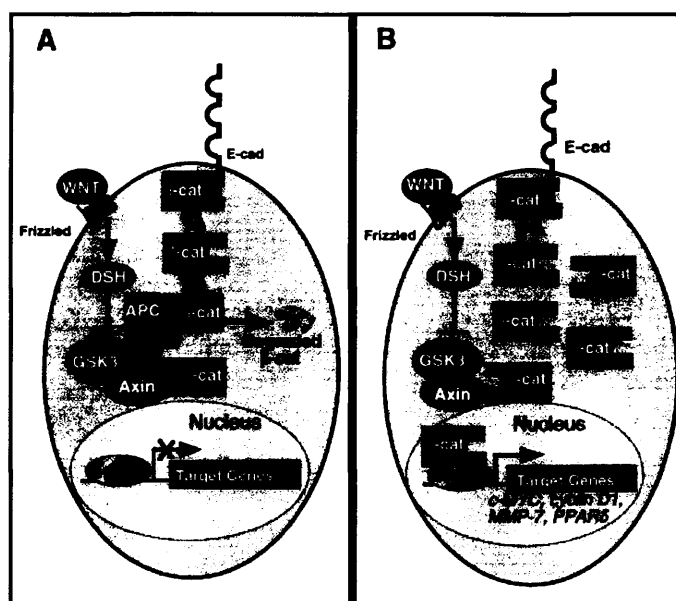


Figura 5. Vía de señalización Wnt

A.2. Gen p53

Es uno de los genes supresores más importantes, ya que en los cánceres humanos su alteración es una de las más frecuentes ^{118, 119}. Su mutación se ha encontrado en una variedad de cánceres. El punto más importante para que un adenoma pase a adenocarcinoma es la mutación de p53 ¹²⁰. Sin embargo es una mutación tardía en la transición de adenoma a CCR. Aquellas personas con el gen p53 alterado tienen una predisposición hacia el cáncer. Se sabe que en muchos tumores este gen está inactivado, si se introduce un gen normal en las células tumorales se ha observado que detiene el crecimiento y que incluso puede provocar una reversión de la transformación maligna ¹⁰.

La mutación en p53 es frecuente en los carcinomas colónicos primarios (75% de los CCR) pero es rara en los pólipos, debido a este hecho se cree que es un punto

importante en la conversión de adenoma a adenocarcinoma ¹²¹. El 40-50% de los CCR tienen mutaciones en el gen p53 ¹²².

Se localiza en el cromosoma 17p. Codifica para una proteína nuclear de vida media corta que es un factor de transcripción (figura 6), se une directamente al ADN y activa la transcripción de genes cuya función es parar el ciclo celular para permitir que una célula dañada se repare a si misma o sufra apoptosis ¹²³. Se piensa que el mecanismo supresor de tumor está relacionado con su función activadora de la transcripción ya que la gran mayoría de las mutaciones observadas en tumores humanos se encuentran en el dominio de unión al ADN ¹²⁴. Es decir, está implicada en la regulación del ciclo celular, replicación del ADN y en la apoptosis ¹²⁵ (figura 7). Es un potente inhibidor de la proliferación celular cuyo objetivo es mantener la integridad de los genes y prevenir la división celular con ADN dañado ^{126, 127}. Por tanto el control de su actividad es esencial durante el desarrollo y el crecimiento normal.

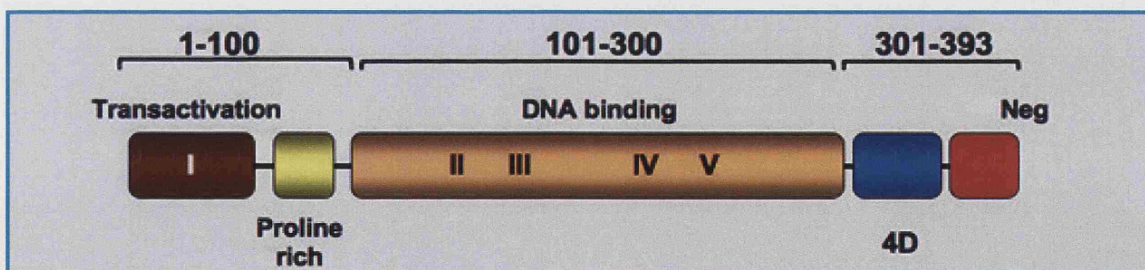


Figura 6. Estructura de la proteína p53

La proteína p53 actúa de sensor celular de estrés, así en respuesta a un daño en el ADN, hipoxia u otros estados de estrés la proteína p53 se sobreexpresa. Su sobreexpresión causa la parada del ciclo celular en la fase G1 o la apoptosis ^{125, 128}. El ADN dañado se repara en esta etapa del ciclo celular evitando la propagación de

mutaciones potencialmente oncogénicas. El papel de la proteína p53 es controlar la fase G1, activa la expresión de la proteína p21 waf impidiendo que la célula pase a la fase S, es decir el ADN no se replicará. Aquellas células con alguna alteración en p53 no tendrán este punto de control y podrán acumular alteraciones génicas más rápidamente, se podrán replicar con el ADN dañado, de este modo podrá disminuir la probabilidad de apoptosis y se facilitará la carcinogenesis ^{129, 130}.

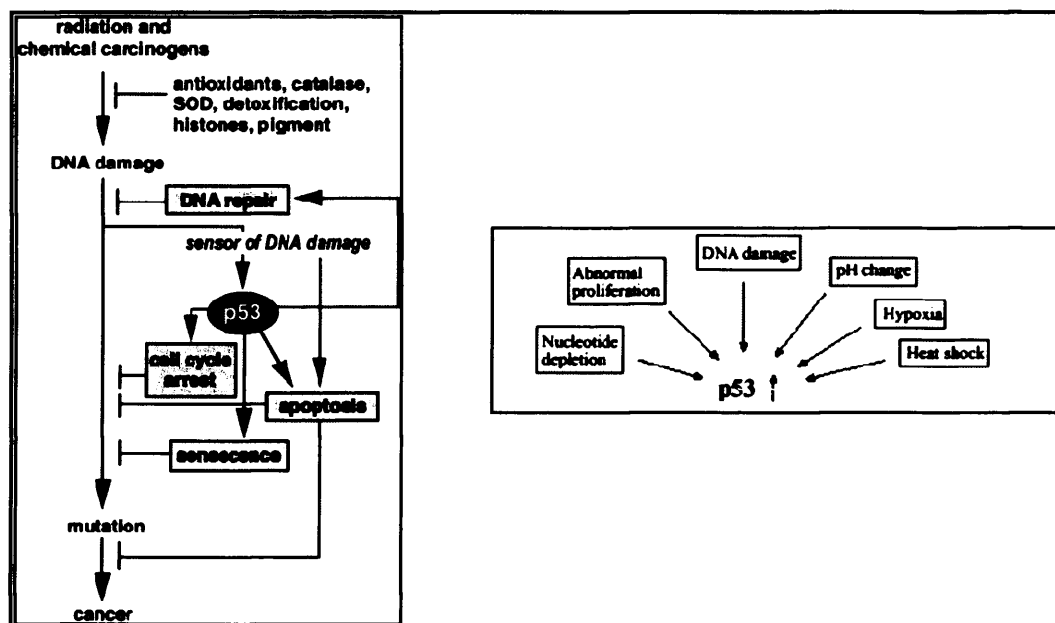


Figura 7. Funciones de p53 y estímulos de p53

A.3. Gen DCC

Es un gen supresor. Se sitúa en el cromosoma 18q. Está alterado hasta en un 70-80% de los CCR. El 70% de los CCR tienen pérdida de heterocigosidad (LOH) en el brazo corto del cromosoma 18 ¹³¹. Su expresión se encuentra disminuida en más del 50% de los CCR ^{132, 133}. Su alteración es previa a la de p53 ya que se encuentra en un

gran número de adenomas grandes con displasia pero es poco frecuente en los pequeños. Representa el tercer paso del modelo de Vogelstein ¹³⁴.

Codifica para una proteína transportadora neural de adhesión celular ¹³¹(figura 8). Esta proteína tiene una masa molecular de 200kDa, su dominio extracelular guarda homología con moléculas de adhesión celular ¹³⁵. Es receptor de un quimio-atrayente axonal: la netrina 1 (participa en el crecimiento axonal durante el desarrollo del sistema nervioso) ¹³⁶.

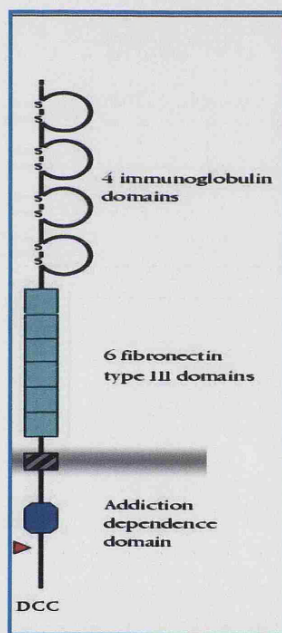


Figura8. Estructura de la proteína DCC

Su función está relacionada con la mediación de las interacciones célula-célula que son responsables de la arquitectura de la mucosa colónica. Además controla la división y diferenciación celular ¹³¹.

Su alteración provoca desdiferenciación, proliferación o metástasis porque se produce la relajación de la inhibición del crecimiento mediada por la interacción

intracelular y la membrana basal ^{10, 131}. Algunos estudios demuestran que su mutación se relaciona con una moderada diferenciación, con metástasis y con un peor diagnóstico ^{137, 138}.

A.4. Gen K-ras

La familia ras fueron los primeros oncogenes en conocerse. Está formada por tres miembros: H-ras, K-ras, N-ras. La prevalencia de mutación suele ser K-ras.

Es un componente esencial de la señalización intracelular desde los receptores de superficie de la célula activados hasta los factores de transcripción nucleares. Esta vía de transducción de las señales es conocida como RAS/RAF/MEK/ERK/MAP cuya función es regular el crecimiento celular, la proliferación, diferenciación y supervivencia celular en respuesta a factores de crecimiento, citoquinas y hormonas ¹³⁹ (figura 9). Esta cascada es activada por la proteína ras que es una proteín-quinasa de 21kD activada al unirse a guanosín trifosfato (GTP) (figura 10). Ras-GTP activa a RAF en la membrana plasmática que a su vez activa por fosforilación a la quinasa MEK, ésta por fosforilación activa a ERK que fosforilará a proteínas dianas como Rsk y factores de transcripción nucleares. Además ERK induce la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) por lo que permitirá al tumor desarrollar su propio sistema angiogénico ¹⁴⁰. ERK permite la supervivencia de la célula porque evita la apoptosis ¹⁴¹. También induce la expresión de las integrinas por tanto influye en la migración celular y metástasis.

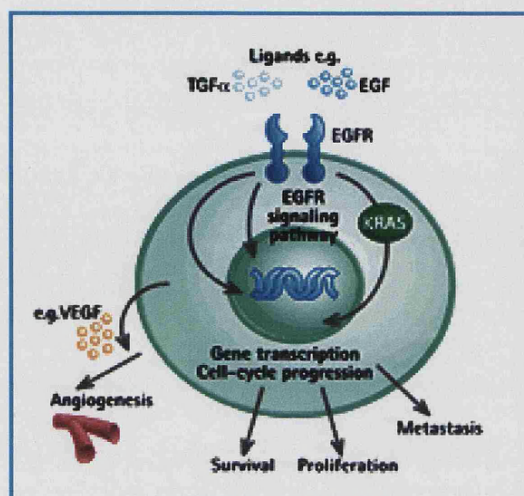


Figura 9. Funciones de K-ras

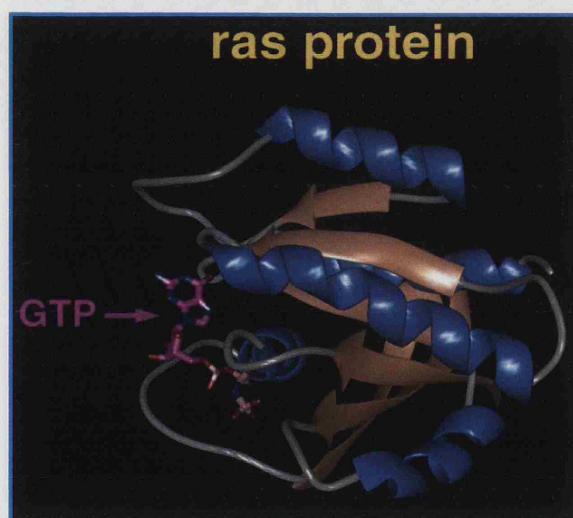


Figura 10. Proteína K-ras 10

Las mutaciones en este gen provocan la alteración en la vía de señalización, lo que permite en último término el aumento de la señal mitogénica. La alteración en el gen K-ras ocurre en un momento temprano de la tumorigenesis del CCR y tiene lugar entre la mutación de APC y la inactivación de DCC y p53¹²⁰. Se ha llegado a esta conclusión porque se ha observado los mismos puntos de mutación en pacientes con adenocarcinoma que en pacientes con adenoma y porque se encuentran en el 58% de los

adenomas mayores de 1cm y en el 47% de los carcinomas y de los pólipos displásicos grandes, pero en menos del 9% de los adenomas menores de 1cm ¹⁴². Debido al momento en el que tienen lugar estas mutaciones se cree que en el futuro podrá ser utilizado como un biomarcador para la detección temprana de CCR. Aun no está claro si podrá predecir la supervivencia de CCR ya que en algunos estudios se relaciona con la agresividad del tumor pero no en todos ¹⁴³. Las alteraciones en ras se asocian con características histopatológicas (mayor tamaño y mayor displasia) ¹⁰. Los puntos calientes en este gen están situados en los codones 12 y 13 ^{143, 144}.

Las mutaciones en K-ras tienen lugar en una gran variedad de carcinogenesis humanas. Estas mutaciones estimulan la proliferación celular, su transformación y diferenciación ⁷⁴.

K-ras también está implicado en la tumorigenesis de cáncer de pulmón, ovario y en el pancreático ⁹⁴.

V.B. Vía de inestabilidad de microsatélites

Los microsatélites están implicados en la carcinogenesis del CCR esporádico y hereditario ^{99, 145-147}. Estudios en pacientes con HNPCC demostraron que estos tumores podían estar causados por mutaciones en la línea germinal de los genes reparadores de ADN. Hoy en día se han identificado 5 genes: MSH2 (cromosoma 2p), MLH1 (cromosoma 3p), hPMS1 (cromosoma 2p), hPMS2 (cromosoma 7q) y hMSH6/GTBP. Los genes que sufren mayor frecuencia de mutaciones en HNPCC son el MLH1 y MSH2 ¹⁴⁸. Además la inactivación del mecanismo reparador se encuentra en el 15% de los CCR esporádicos ¹⁴⁹, la mayoría de estas alteraciones son debidas a la metilación del promotor causando la silenciación epigenética del gen ¹⁵⁰⁻¹⁵².

Los microsatélites son secuencias repetitivas de ADN de función desconocida, son numerosos y se distribuyen a lo largo de todo el genoma¹⁵³. Normalmente formadas por secuencias repetitivas de mono-, di-, tri- o tetranucleótidos¹⁵⁴. La mayoría de los microsatélites se localizan en secuencias no codificantes o intrones del genoma, se cree que las mutaciones en esas regiones son silenciosas y por tanto sin consecuencias, aun es desconocido su papel en la transformación celular pero es un buen indicador del estado de la MSI. Algunos genes contienen microsatélites en sus exones causando la mayoría de veces la inactivación del gen¹⁵⁵.

Durante la replicación la ADN polimerasa puede cometer errores, suelen ser más frecuentes en secuencias repetitivas, es decir en los microsatélites. Estos errores son identificados y corregidos por las proteínas del sistema de reparación del ADN durante la replicación¹⁰¹. Pueden corregir errores en una base y/o en la inserción o delección de una secuencia¹⁵⁶. Una alteración genética que inactive cualquier gen del sistema reparador permite la acumulación de mutaciones en cada división celular facilitando la transformación tumoral^{157, 158}.

El fenómeno de la MSI es el resultado de un fallo en el mecanismo de reparación del ADN¹⁵⁹. Aquellos tumores con este mecanismo defectuoso acumulan alteraciones (delecciones y/o inserciones de algunos nucleótidos) en las regiones de los microsatélites¹⁵⁵. Se define MSI como el cambio en la longitud de la secuencia del ADN, debido tanto a la inserción como a la delección de secuencias repetitivas de mono-, di-, tri- o tetranucleótidos¹⁶⁰ en la región de un microsatélite dentro del tumor cuando lo comparamos con el tejido normal¹⁰¹. MSI se ha encontrado en distintos cánceres humanos debido principalmente a defectos en los genes del sistema reparador MLH1 y MSH2^{161, 162}.

Los genes del sistema reparador se comportan como genes supresores de tumor. La tasa de mutación en células cancerosas con una alteración en este sistema es de 100 a 1000 veces superior a la de las células sanas ¹⁶³. La acumulación de alteraciones acelera la progresión del tumor y podría explicar porque la mayoría de los pacientes con Síndrome de Lynch desarrollan CCR comparado con el 5% de la población normal ¹⁶⁴.

La MSI se considera un marcador de la función alterada del sistema reparador del ADN ^{99, 152}. Son marcadores moleculares útiles debido a su ubicuidad, a su herencia mendeliana co-dominante y a su gran polimorfismo. Su origen y función aun son desconocidas ¹⁵³. El método de estudio de MSI recomendado por el *National Cancer Institute* es el análisis en los tejidos tumorales y no tumorales de 5 marcadores de microsatélites: mononucleótidos (BAT 26 y BAT 25) y repeticiones de dinucleótido (D2S123, D5S346, D17S250) (tabla 5) ^{100, 165}. De acuerdo con el número de marcadores se pueden definir tres tipos de tumores: inestabilidad de alto grado (MSI-H), inestabilidad de bajo grado (MSI-L) y estabilidad microsatelital (MSS). Cuando en un tumor más de un tercio o más del 30% de los microsatélites estudiados muestran inestabilidad se considera al tumor MSI-H. MSI-L cuando presenta menos de un tercio o menos del 30% y MSS cuando ningún marcador estudiado muestra inestabilidad ¹⁶³.

MICROSATÉLITE	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	OLIGONUCLEÓTIDOS REPETIDOS ¹
BAT25	4q12	TTTT.T.TTTT.(T) ₇ .A(T) ₂₅
BAT26	2p	(T) ₅T.(T) ₄₀
D2S123	2p16	(CA) ₁₃ TA(CA) ₁₅ (T/G A) ₇
D5S346	5q21/22	(CA) ₂₆
D17S250	17q11.2-q12	(TA) ₇(CA) ₂₄

Tabla 5. Oligonucleótidos repetidos de las secuencias MSI consenso

1. Los puntos suspensivos representan nucleótidos no repetidos

La caracterización de la situación de la MSI tiene interés tanto para entender el proceso de la tumorigenesis como por razones clínicas: es un marcador útil para identificar enfermos de Síndrome de Lynch y se ha observado que los CCR esporádicos con una MSI-H tienen un mejor pronóstico. En un estudio prospectivo realizado por Vidaurreta et al se observó que el 9% de los pacientes de CCR muestran una MSI-H y el 11,3% MSI-L y se demostró que los CCR con MSI-H presentaban un mejor pronóstico ¹⁶⁶; varios estudios retrospectivos ¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ y un meta-análisis apoyan esta hipótesis ¹⁷¹ y además se piensa que podría afectar a la eficacia de la quimioterapia ^{171, 172}.

Algunos estudios han sugerido que los CCR con MSI-H tienen una mayor tasa de supervivencia ^{173, 174} y pueden responder de diferente modo a la quimioterapia que los tumores no MSI ^{175, 176} por estos dos motivos es importante reconocer a este grupo de pacientes.

Hay suficiente evidencia de que el fenotipo MSI-H en el CCR tiene implicaciones clínicas y pronósticas: suelen presentarlo pacientes menores de 50 años, además son frecuentes los cánceres sincrónicos o metacrónicos. Desde el punto de vista del tratamiento los pacientes con MSI-H pueden ser menos sensibles a los agentes que dañan el ADN y más resistentes a la quimioterapia y/o a la quimioprevención ya que no expresan (o a bajos niveles) la COX-2. Varios estudios demuestran que los CCR con MSI-H son menos agresivos y por tanto tienen mejor supervivencia que los CCR MSS o MSI-L ^{169, 177} aunque hay algunos estudios contradictorios ¹⁷⁸⁻¹⁸⁰.

VI. FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL

La angiogenesis es el desarrollo y la formación de nuevos vasos sanguíneos. Es importante en procesos fisiológicos y patológicos, como son el crecimiento, la ovulación o la neoplasia.

Los procesos patológicos que causan el crecimiento tumoral son muy similares en todos los tipos tumorales, la angiogenesis es uno de ellos ¹⁸¹. Están aumentando las evidencias de que el proceso angiogénico comienza en las etapas premalignas de la mayoría de los cánceres ¹⁸².

La angiogenesis juega un papel muy importante en la progresión tumoral porque a través de los vasos sanguíneos se realiza el aporte de nutrientes, factores de crecimiento y oxígeno y la eliminación de dióxido de carbono y desechos, todo esto es necesario para la formación de nuevo tejido. Además, a través de los vasos se diseminan células tumorales ¹⁸³. La angiogenesis es necesaria para que un tumor avascular de pequeño tamaño y localizado progrese a un tumor potencialmente metastásico ¹⁸⁴. La regulación de la angiogenesis es el paso crítico en el crecimiento tumoral y puede ser crítica para la metástasis ^{185, 186}.

Por estos motivos el control de la angiogenesis tumoral es una de las terapias anticancerosas más prometedoras ¹⁸⁷. Hay evidencias de que las intervenciones terapéuticas que previenen la angiogenesis disminuyen la agresividad del tumor; por lo tanto estos tratamientos también pueden prevenir o retrasar la progresión de condiciones premalignas a cáncer ¹⁸².

Como el crecimiento del tumor se relaciona con la angiogenesis se han realizado estudios sobre la relación entre la angiogenesis y los parámetros de proliferación celular en distintos tipos de tumor, sin embargo sus resultados son contradictorios ¹⁸⁸⁻¹⁹².

Estudios recientes han mostrado que algunos oncogenes, como el p53, están implicados en la regulación de la angiogenesis ¹⁹³. Se ha observado que la inactivación de la función de p53 en células tumorales induce la activación de la angiogenesis ¹⁹⁴.

La angiogenesis se correlaciona con la progresión de cáncer y/o peor pronóstico del cáncer. Dependiendo del tipo tumoral y las condiciones microambientales puede activarse en diferentes estadios del desarrollo tumoral ¹⁹⁵. El aumento de la densidad vascular se correlaciona con mayor incidencia de metástasis y por tanto con un peor pronóstico del cáncer ¹⁹⁶.

La angiogenesis requiere la liberación de factores de crecimiento mitógenos al endotelio, además el proceso es dependiente del equilibrio entre los factores angiogénicos y antiangiogénicos.

El VEGF es el factor más predominante y potente de todos los factores implicados en la angiogenesis ¹⁹⁷. En 1983 fue identificado por Senger como factor de permeabilidad vascular ¹⁹⁸ y posteriormente por Leung como factor de crecimiento vascular endotelial en 1989 ¹⁹⁹.

Es el único factor conocido, hasta el momento, que está presente a lo largo de todo el ciclo celular. Durante el desarrollo del tumor pueden comenzar a activarse vías angiogénicas secundarias como: el factor de crecimiento básico del fibroblasto (β FGF), factor de crecimiento de transformación beta (TGF β), el factor de crecimiento placentario (PIGF) y el factor de crecimiento celular endotelial derivado de plaquetas

(PD-ECGF). Mientras que estas vías secundarias son activadas, el VEGF continúa sobreexpresándose y sigue siendo uno de los mediadores críticos de la angiogenesis.

Sus funciones son estimular el crecimiento, la supervivencia, la proliferación y la migración de células endoteliales vasculares y por tanto inducir la proliferación de nuevos vasos sanguíneos²⁰⁰⁻²⁰². Además de inducir la síntesis de NO y prostaciclina (PGI₂), aumentar la permeabilidad vascular y potenciar la expresión de genes. Por esto se considera que es una nueva diana para la terapia antineoplásica¹⁸⁷. Estas terapias consisten en utilizar anticuerpos contra la molécula de VEGF o contra su receptor o pequeñas moléculas inhibidoras de las quinasas de los receptores del VEGF²⁰³.

El mecanismo por el cual estimula la supervivencia de las células endoteliales está basado en una señalización anti-apoptótica: activa la cascada de señales Akt/PBK (que es dependiente de la quinasa PI3) y además induce la expresión de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y A1.

La proliferación celular la potencia a través de la activación de quinasas reguladoras de señal extracelulares (ERKs) 1 y 2 y de la proteinquinasa N-terminal c-Jun.

La migración de las células endoteliales es un paso inicial de la angiogenesis. El VEGF la estimula al inducir la fosforilación de FAK, paxilin y de la quinasa p38MAP que induce la reorganización de la actina y migración celular.

El VEGF estimula la producción endotelial de NO y PGI₂, compuestos relacionados con la angiogenesis y el aumento de la vasopermeabilidad.

El VEGF modula la permeabilidad vascular porque estimula la formación de fenestras, aunque el mecanismo es desconocido todavía.

El VEGF activa la expresión de varios genes (NOS, factor tisular, proteínas anti-apoptóticas, PIGF) y de factores de transcripción (Ets1, NFAT, Stat) ²⁰⁴.

Estudios preclínicos con inhibidores de VEGF demuestran que los tumores son altamente dependientes de VEGF tanto en el desarrollo inicial como durante todo su ciclo vital; en estos mismos estudios se demuestran efectos antitumorales significativos al inhibir dicha molécula ^{205, 20}.

El VEGF puede afectar a la vasculatura del tumor de tres maneras diferentes:

- en el desarrollo del tumor ayuda a formar nuevos vasos. Se ha demostrado que esta molécula estimula el crecimiento del tumor tanto en sitios primarios como en las metástasis porque recluta células progenitoras derivadas de la médula ósea.
- estimula el crecimiento de los nuevos vasos porque proporciona el aporte metabólico y los estímulos necesarios para la proliferación y migración de células endoteliales.
- permite la supervivencia vascular porque inhibe la apoptosis de las células endoteliales

²⁰⁷.

La expresión del gen VEGF es regulada por varios estímulos: hipoxia, factores de crecimiento, p-53, estrógenos, TSH, óxido nítrico. Bajo condiciones de hipoxia la célula sintetiza el factor de transcripción HIF (factor inducible por hipoxia) que induce la expresión del gen VEGF ²⁰⁸.

VEGF pertenece a una familia de seis miembros que regulan el crecimiento y diferenciación de los componentes del sistema vascular, especialmente de los vasos linfáticos y vasos sanguíneos (tabla 6). El VEGF-A es el miembro más abundante, se le conoce como VEGF, es una glicoproteína de 45kDa, homodimérica y básica ¹⁸⁷, actúa como mitógeno específico para las células endoteliales in vitro y como molécula angiogénica in vivo ¹⁹⁷.

MIEMBROS DE LA FAMILIA VEGF	RECEPTORES	FUNCIONES
VEGF (VEGF-A)	VEGFR-1	Angiogenesis
	VEGFR-2	Mantenimiento vascular
	Neuropilina-1	
VEGF-B	VEGFR-1	Desconocido
VEGF-C	VEGFR-2	Linfangiogenesis
	VEGFR-3	
VEGF-D	VEGFR-2	Linfangiogenesis
	VEGFR-3	
VEGF-E (factor viral)	VEGFR-2	Angiogenesis
PlGF	VEGFR-1	Angiogenesis
	Neuropilina-1	Inflamación

Tabla 6. Miembros de la familia VEGF

Las proteínas VEGF se unen a receptores tirosin-quinasa VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) y VEGFR-3 y a co-receptores no enzimáticos: neuropilina-1 y 2 (Nrp-1 y Nrp-2). También se pueden unir a proteoglicanos heparán sulfato de la membrana plasmática o de la matriz extracelular²⁰⁹.

Los receptores VEGF (VEGFR) están formados por tres regiones: una región extracelular con 7 dominios similares a las inmunoglobulinas; una región transmembrana y una región intracelular con un dominio tirosin-quinasa. La unión de VEGF con VEGFR produce la dimerización del receptor y su autofosforilación, lo que provoca la activación de una cascada de señales intracelulares que en último término

inducen el aumento de la permeabilidad microvascular y la angiogenesis^{186, 210, 211} (figura 11).

El VEGFR-1 se une a VEGF, VEGF-B y PlGF. Este receptor tiene una gran afinidad por VEGF aunque tiene una baja actividad tirosin-quinasa. Debido a su alta afinidad por VEGF evita la activación de otros receptores de este ligando como el VEGFR-2 (es decir inhibe su activación). El VEGFR-1 es esencial durante el desarrollo, en la hematopoyesis, migración de los monocitos y en el reclutamiento de células progenitoras derivadas de la médula ósea.

El VEGFR-2 es el mediador predominante de la vía de la señalización angiogénica inducida por VEGF. Está implicado en la proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales y en la permeabilidad vascular. A pesar de tener menor afinidad por el VEGF que el receptor anterior tiene una gran actividad quinasa. La unión con su ligando provoca la dimerización del receptor y la autofosforilación que induce una cascada de señales a través de PI3K, Raf, p38/MAPK y p43/44 MAPK.

El VEGFR-3 se une a VEGF-C y VEGF-D. Sus funciones están implicadas en la angiogenesis y linfangiogenesis en los adultos.

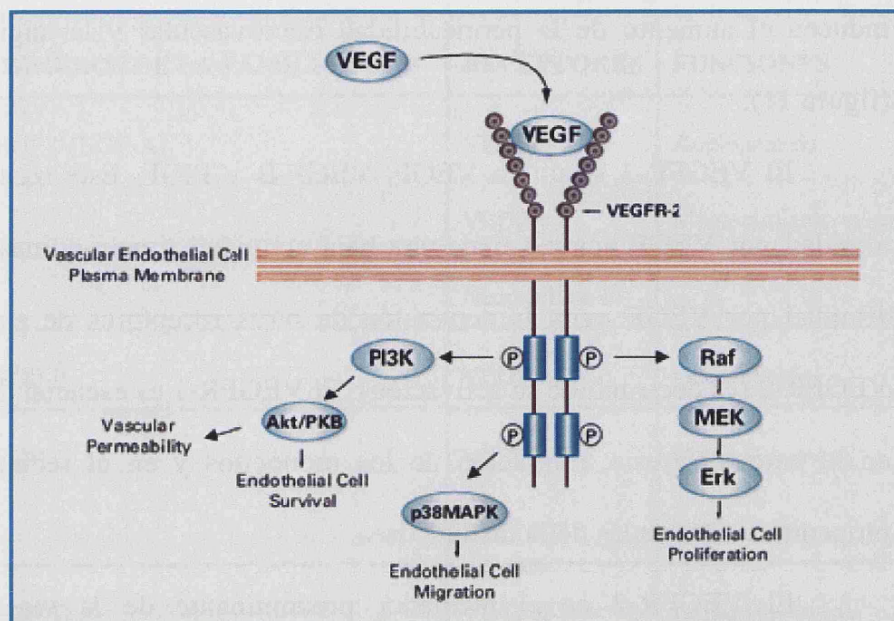


Figura 11. Vía VEGF

El VEGF se expresa en una gran variedad de tumores, incluyendo cáncer de pulmón, mama, renal, glioblastoma, ovario, CCR,... Se expresa con más intensidad en células neoplásicas que en células endoteliales, por el contrario el VEGFR-1 y VEGFR-2 tienen una mayor expresión en células endoteliales. Estos hallazgos apoyan el concepto de que la molécula VEGF actúa como mediador paracrino: el VEGF es secretado por células neoplásicas y actúa en las células endoteliales cercanas ²⁰⁹. Además VEGF tiene funciones autocrinas: permite la supervivencia de las células malignas porque las protege de situaciones de estrés y de la apoptosis ²¹². Es decir está implicado en la proliferación celular endotelial, supervivencia y migración de células endoteliales y monocitos ²¹³⁻²¹⁵.

El gen VEGF se localiza en el cromosoma 6p21.3, está formado por 8 exones y 7 intrones ^{216, 217}. Su ARN mensajero presenta un "splicing" alternativo ^{209, 218, 219} que da lugar a nueve isoformas, de las cuales las más importantes son VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅,

VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆, este “*splicing*” provoca diferencias en el número de aminoácidos y en la expresión de los dominios de unión al heparán sulfato del proteoglicano, codificados en los exones 6 y 7.

Actualmente se conocen varios polimorfismos de un único nucleótido en este gen (SNPs). Estos SNPs influyen en la expresión del gen, producción y concentración de la proteína VEGF, además, pueden influenciar el proceso de la angiogenesis y podrían relacionarse con una variación intraindividual del riesgo y progreso de tumores y con la resistencia a los tratamientos ²²⁰. Varios de estos SNPs se han asociado con diferencias en la expresión del gen VEGF y se ha demostrado que están implicados en el desarrollo de varios tumores, entre ellos el CCR ^{221, 222}. Hay estudios que demuestran que son factores pronóstico en el CCR, además pueden ayudar a agrupar a los pacientes de mejor y peor pronóstico ²²³. Varios SNPs se localizan en la región del promotor o en las regiones no traducidas (UTR) 3' y 5'; por ejemplo -2578C/A, -1154G/A, -634 G/C desde la posición de inicio de la transcripción (UTR 5'); el +936C/T en la región 3' UTR. UTR 3' y 5' contienen los elementos reguladores sensibles a la hipoxia por lo que contribuyen a la alta variabilidad de la síntesis de VEGF en los tejidos. Los SNPs localizados en UTR 5' afectan a la eficacia de la traducción de la proteína y los de la UTR 3' influyen en las concentraciones plasmáticas y en la expresión de VEGF en los tejidos. Sin embargo, se cree que solo unos pocos polimorfismos causan un efecto en la traducción de VEGF ²⁰⁴. Los alelos -2578C, -1154G y +936C se asocian con un aumento de la expresión de VEGF ²²⁴. El alelo +936 T se asocia con menor riesgo de cáncer de mama pero con mayor riesgo de CCR, el alelo -634C se asocia con mayor riesgo de cáncer prostático y con menor riesgo de CCR ²⁰⁴.

El incremento de su expresión se ha relacionado con el desarrollo del tumor y es debido a que el VEGF participa en el proceso angiogénico aunque el mecanismo es desconocido todavía ²²⁵.

Staton et al observaron que un aumento significativo en la densidad de los microvasos sanguíneos era inducido con el inicio de la displasia y era paralelo a un aumento significativo en la expresión de VEGF en la misma etapa de la progresión ²²⁶.

Cristi et al en un estudio realizado en pacientes con CCR observaron una correlación significativa entre la expresión de VEGF, densidad de vasos y la expresión de p53 ²²⁷.

Estudios clínicos y preclínicos indican que el VEGF es el factor angiogénico predominante en el CCR y que está asociado a la formación de metástasis ²²⁸. Hay estudios que demuestran que los tumores que tienen niveles altos de expresión de VEGF muestran un peor pronóstico que los tumores con una expresión menor ²²⁹. Además niveles preoperatorios elevados de VEGF se asocian significativamente con un peor pronóstico ²³⁰.

Sin embargo, otros estudios no demuestran el valor pronóstico del VEGF en el CCR ²³¹. Ni encuentran correlación entre su expresión y la supervivencia ²³².

VII. EphB2

La familia Eph es la mayor subfamilia de los receptores tirosinquinasa^{233, 234, 235}, está compuesta por 14 receptores.

Tienen un dominio citoplasmático quinasa, que se activa por la unión de sus ligandos (las efrinas) al dominio globular de su región extracelular^{236, 237}.

Tanto los Eph como las efrinas se pueden dividir en dos subclases en base a la homología de la secuencia, estructura y afinidad de unión: EphA y EphB, efrinas A y efrinas B.

Los Eph se localizan en la superficie celular, al unirse sus ligandos traducen señales de forma bidireccional. Las efrinas se localizan en la superficie de células vecinas^{238, 239, 240}. La efrina A se ancla a la membrana plasmática a través del glucosil-fosfatidilinositol. Por el contrario, un dominio transmembrana ancla la efrina B a la membrana plasmática (figura 12)^{233, 241}. Hasta la fecha se han identificado 8 ligandos²⁴². Las efrinas A son los ligandos de EphA y las efrinas B de EphB. Una excepción es la efrina A4 que se puede unir tanto a EphA como a EphB.

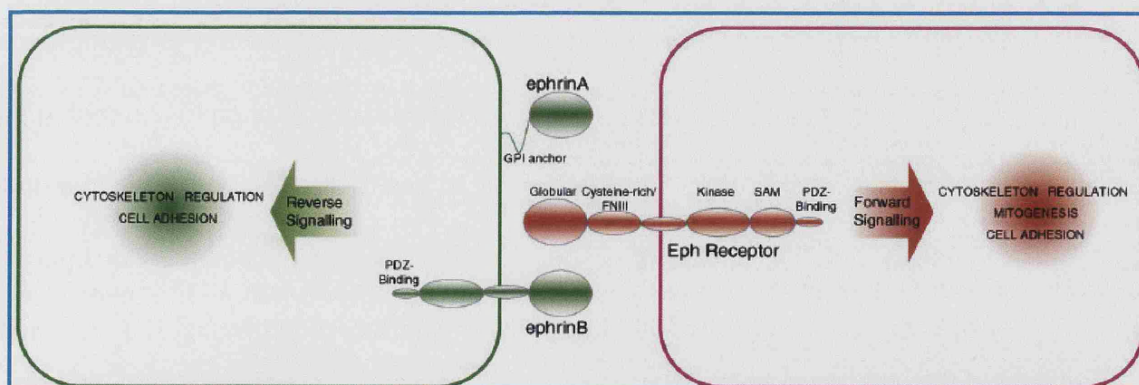


Figura 12. Señalización Eph-efrinas

Estos receptores son expresados en tejidos adultos con modelos específicos de órgano. En el intestino el más importante es EphB2²³³.

Los Eph tienen funciones únicas dependiendo del órgano y línea celular. EphB4 y EphB2 tienen una expresión restrictiva en las venas y arterias respectivamente^{243, 244}. Recientemente EphB2 y EphB3 se han relacionado con el control de la segregación y posición de las células en las criptas del intestino²⁴⁵. El EphB2 regula la vía de señalización ras/map e inhibe a la abl-tirosinquinasa en las células endoteliales y neuronales^{246, 247}.

La unión de la efrina con su receptor es dependiente de las interacciones célula-célula y este contacto célula a célula es necesario para la activación de la cascada de señales²⁴⁸. Como característica de este sistema de señalización hay que destacar que la unión efrina-Eph permite tanto la activación del receptor como la transducción de señales reversas en la célula que expresa la efrina es decir es una señalización bidireccional²³⁶. Cuando los ligandos se unen a sus receptores se fosforila la tirosina y se inicia la señalización reversa. Las efrinas B también pueden traducir señales por una vía dependiente de fosforilación. Las efrinas A pierden su estructura transduciendo señales por otros mecanismos: a través de integrinas o miembros de la familia Src²⁴¹. El complejo Eph-efrina forma una estructura cristalina especial. Por ejemplo cada ligando efrina B2 se une con dos receptores EphB2 y cada receptor EphB2 también puede unirse con dos efrinas B2, este complejo forma una estructura en anillo y es fundamental para la iniciación de la señales Eph-efrina²⁴⁹. Cuando los Eph son activados por sus ligandos varias tirosinas son fosforiladas y varios dominios quinasas son activados²⁵⁰. Las tirosinas fosforiladas sirven de anclaje para dominios que contienen SH2 o proteínas con dominio PDZ o adaptadores, incluyendo p59fyn, PI3 quinasa, Grb2, Grb10, Nck,

SHEP1²⁴¹. EphB2 activado puede activar a Ras, AF6, LMW-PTp y a la proteína p62²⁴¹. A través de la cascada de señalización la familia Eph ejerce un control sobre el comportamiento celular así como de sus actividades biológicas, pero al mismo tiempo los receptores EphB tienen una capacidad autoinhibitoria²⁵¹.

Esta vía de señalización bidireccional entre las células está implicada fundamentalmente en aquellos procesos del desarrollo que requieren un patrón y un movimiento organizado de células²³³ como son la embriogenesis y la diferenciación de los sistemas nervioso^{252, 253, 254} y vascular^{234, 252, 253, 255}. Son reguladores de la vasculogenesis, embriogenesis y están implicados en la angiogenesis^{256, 257} y tumorigenesis²⁵⁸. Además el sistema Eph/efrinas es esencial para la correcta formación de las criptas y la villi en el epitelio intestinal²⁴⁵. Es decir sus funciones tienen como efector al citoesqueleto^{236, 259, 260}. Además están implicadas en el control de otras funciones celulares incluyendo las interacciones vasculares, actividad integrina y funciones epiteliales específicas^{245, 261}. También está implicado en el mantenimiento de la organización tisular y en la morfogenesis dentro del proceso regenerativo ya que la mayoría de los Eph y efrinas están presentes en los tejidos sanos.

En los últimos años se ha observado una expresión diferencial en los genes de las efrinas y Eph en varios tumores humanos^{262, 263}: melanoma maligno, neuroblastoma, próstata, mama, cáncer de pulmón de células pequeñas, endometrio, esófago, gástrico y CCR^{263, 264, 265, 266}. Y se ha observado su implicación en el desarrollo de varios tumores: melanoma, glioblastoma, carcinoma pulmonar y carcinoma de mama^{264, 265, 267}.

Los cambios en los patrones de expresión se podrían correlacionar con el comportamiento tumoral: con una mayor invasividad, un mayor potencial metastásico, una mayor vascularización y por consiguiente un peor pronóstico. Ya que Eph y las

efrinas son determinantes de la angiogenesis tumoral junto con el VEGF están adquiriendo un mayor interés dentro de la investigación del cáncer ²⁶⁸. A pesar de la falta de evidencia del papel de Eph en la mitogenesis hay numerosos artículos que correlacionan su expresión con la progresión tumoral ^{261, 267, 269, 270, 271}. Pero aun no se ha clarificado como la actividad de este receptor contribuye a la progresión tumoral. Se ha postulado que podrían exacerbar la tumorogenesis por su influencia en la adhesión celular, motilidad, patrón y posición celular ²⁶¹.

Ya que la pérdida del control de la mitosis, del patrón epitelial y de la arquitectura tisular son características de la tumorogenesis, la interrupción de la correcta expresión y función del receptor EphB puede estimular la carcinogenesis ^{245, 272, 273} porque Eph modula la motilidad celular, la invasión, metástasis y angiogenesis ²⁶¹. En diversos tumores, incluyendo el CCR, se ha observado una alteración en la expresión de distintos Eph, incluyendo EphB2.

El gen EphB2 se localiza en la región cromosómica 1p35-1p36. En varios tipos de cánceres esta región se encuentra alterada ^{274, 275}. Los posibles mecanismos de inactivación del gen pueden ser tanto alteraciones genéticas como epigenéticas. Es un fragmento cromosómico que sufre con frecuencia pérdida alélica en el CCR (lo que indica que EphB2 podría ser un gen supresor) ^{276, 277}, además en el exón 17 de este gen hay una región de 9 adenosinas (9A) que sufre con frecuencia mutación ²⁷⁸. También se ha propuesto como mecanismo alternativo de inactivación del gen la hipermetilación de islas CpG de su promotor ^{278, 279}. Por otro lado EphB2 se ha identificado como diana de la vía de señalización Wnt, esta vía es un regulador fisiológico de las células precursoras intestinales y está hiperactivada en un paso temprano de la secuencia adenoma carcinoma del CCR ^{235,245}.

Aun no está claro como la actividad de Eph puede contribuir al fenotipo maligno. Sin embargo varias evidencias muestran que EphB2 está implicado en la progresión de tumores y que actúa como gen supresor^{280, 281, 282, 283}; su gen se localiza en una región cromosómica que suele estar alterada en los tumores. Además varios estudios inmunohistoquímicos han mostrado que la expresión de varias isoformas de EphB están a menudo suprimidas en CCR invasivos. Alazzouzi et al han encontrado una alta incidencia de MSI en CCR y metilación del promotor EphB2 tanto en CCR con MSI o sin ella²⁷⁸. Lesiones premalignas del colon muestran una alta expresión de EphB2 mientras que su expresión se reduce en estadios más avanzados de CCR²⁸⁴. La pérdida de expresión de EphB2 en CCR se ha asociado con un peor pronóstico²⁸⁵. Se ha encontrado en el cáncer prostático una inactivación de EphB2 debido a mutaciones, Huusko et al han descrito varias mutaciones en el cáncer prostático y en líneas celulares²⁸⁰. Varias mutaciones sin sentido se han asociado al cáncer de próstata en afroamericanos con historia familiar de la enfermedad²⁸⁶. Además se han observado mutaciones somáticas en EphB2 en CCR y cáncer prostático y mutaciones en la línea germinal de EphB2 se han asociado con mayor riesgo de cáncer prostático^{278, 280, 286}. En 2005, Alazzouzi et al observaron mutaciones frecuentes en el exón 17 del gen EphB2 en una región de 9A en CCR primario de pacientes mayoritariamente de origen caucasiano (Finlandia, Alemania, España y Japón)²⁷⁸.

Varios estudios nos orientan acerca del papel de EphB2 en el tejido colónico tumoral y sano. En el colon sano está implicado en el control del posicionamiento de las células epiteliales intestinales a través de la interacción con h-catenina y factor de células T²⁴⁵. En el CCR se describió la sobreexpresión tanto de EphB2 como de efrina2^{234, 267, 281}.

La expresión de EphB2 se ha observado en cáncer gástrico, CCR, neuroblastomas, carcinoma de pulmón de células pequeñas, melanoma y en una gran variedad de líneas celulares tumorales^{262, 263, 267, 287}.

Para conocer la importancia biológica de la proteína así como su implicación en la progresión del cáncer se ha estudiado su expresión en tejidos sanos y en distintos tipos de cáncer²³⁵. Mao et al han estudiado la expresión de EphB2 tanto en tejidos sanos como en neoplásicos de distintos órganos y han observado la mayor expresión en el CCR²³⁴, sugiriendo que su expresión es “restrictiva” al CCR sin embargo se ha observado una elevada expresión de su ARNm en cáncer gástrico, esofágico, renal, CCR, teratocarcinoma, coriocarcinoma²⁶⁵ pulmonar, neuroblastomas, endometrio^{239, 267, 287, 288, 289} y en otras líneas celulares tumorales derivadas de cáncer de mama, estomago, esófago, colon o riñón²⁴¹.

Recientemente se ha asociado la pérdida de expresión de EphB2 con la carcinogenesis colorrectal. Varias investigaciones lo demuestran: Battle et al examinaron tanto adenomas colónicos como tumores colónicos y observaron la desregulación de la expresión de EphB2 en la mayoría de los CCR pero no en pequeños adenomas o en criptas aberrantes, a pesar de que la señalización Wnt estaba activada en esos tumores, es decir observaron la pérdida de expresión de EphB2 durante la transformación neoplásica del colon (en cada paso crítico de la carcinogenesis del colon, incluyendo la transición de adenoma a carcinoma, desdiferenciación y metástasis)²⁸⁴. Ésto demuestra una mayor evidencia del papel supresor de EphB2 en CCR. Guo et al investigaron la expresión de EphB2 en la mucosa colorrectal sana, en el adenoma, carcinoma, en los ganglios linfáticos y en las metástasis hepáticas utilizando microarrays de tejidos (TMA) con el objetivo de comprender como la expresión de

EphB2 regula el comportamiento de las células neoplásicas del colon. Este método les permite elucidar la cronología de la expresión de EphB2 y su papel en la progresión del CCR, metástasis y pronóstico. Observaron una pérdida obvia de la expresión de EphB2 en un grupo de CCR paralelo a la invasión del estroma, ganglio linfático o metástasis y a una desdiferenciación tumoral, además su pérdida ocurre en tumores a pesar de que la vía Wnt esté activada. Realizaron un estudio funcional que muestra que EphB2 no afecta a la proliferación por si misma pero si influye en la supervivencia y migración celular. Guo et al han realizado estudios in vitro para demostrar que la activación de EphB2 inhibe la adhesión de las células neoplásicas de colon y su migración y también la formación de colonias de células neoplásicas del colon ²⁹⁰. Además han descrito que la inactivación de EphB2 acelera la tumorigenesis iniciada por mutaciones en APC en el colon y recto de ratones APC^{min/+} lo que demuestra que es un importante gen supresor en el intestino ²⁸⁴. Jubb et al sugieren que la pérdida de expresión de EphB2 por una proporción de células neoplásicas tiene lugar en la transición de adenoma a CCR primario, además hay una tendencia a disminuir su expresión en lesiones metastásicas ²⁸⁵. Debido a estos hallazgos se postula que la vía de señalización de EphB2 contribuye a la progresión de CCR de la misma manera que gobierna el ordenamiento de las células de la cripta ²⁴⁵. La investigación realizada por Lugli et al ²³⁵ corrobora estos hallazgos, ellos observaron que el 100% de los adenomas colónicos expresaban EphB2 lo que hace pensar que este receptor está implicado en la biología de las células epiteliales colónicas. Además en el 33,3% de los CCR observaron una menor frecuencia de positividad de EphB2 lo que indica que la pérdida de su expresión acompaña a la progresión del tumor. Para corroborar esta hipótesis ampliaron su estudio a 1400 CCR con datos patológicos e información del seguimiento clínico. Observaron una asociación

entre la pérdida de expresión de EphB2 y el estadio avanzado y presencia de invasión vascular, crecimiento infiltrativo del tumor y una menor supervivencia. Estos datos les llevan a concluir que la pérdida de su expresión puede facilitar la pérdida de la arquitectura tisular e incluso la invasión y la metástasis. A pesar de que la inactivación de EphB2 parece ser un importante requerimiento en la progresión de CCR aun no está claro como se pierde su actividad durante la progresión tumoral ²⁷⁸.

Se observa una disminución mayor en los tumores de histología serrada ²⁸². También hay evidencias de una desregulación de la expresión de EphB2 en varios tumores intestinales o no intestinales ²³⁵. Se han encontrado inactivación mutacional de EphB2 en líneas celulares tumorales de próstata y en muestras de tumores metastásicos avanzados ²³⁵, esto sugiere un papel de EphB2 en la diseminación metastásica del cáncer prostático ²⁸⁰.

En el estudio realizado por Guo et al observaron que los pacientes con CCR que expresan EphB2 tienen un estadio menos avanzado, una mayor supervivencia global (SG), desarrollan menos recidivas y tienen una mayor supervivencia libre de enfermedad (SLE) independiente al estadio tumoral ²⁹⁰ estos hallazgos son apoyados por el estudio de Jubb et al, quienes demuestran una asociación positiva entre la expresión de EphB2 y una prolongada SLE en el CCR ²⁸⁵. Todos sus datos sugieren que EphB2 tiene un papel en la regulación de la supervivencia y migración celular, es decir puede suprimir la invasión y metástasis en CCR. Aun no está claro como media estas funciones ²⁹⁰. Lugli et al concluyen de su estudio que la EphB2 se expresa mayoritariamente en el epitelio intestinal y que la pérdida de su expresión se asocia con un fenotipo tumoral desfavorable y una peor supervivencia en pacientes con CCR es decir existe una asociación entre la pérdida de expresión de EphB2 y la progresión de

CCR²³⁵. Se ha observado que la silenciación de EphB2 o EphB3 en ratones Apc^{min/+} se correlaciona con una mayor agresividad de la tumorigenesis colorrectal²⁸³.

La disminución de la expresión de EphB2 se asocia con una mayor invasividad y metástasis es decir con un peor pronóstico^{234, 235, 290}. Recientemente se ha propuesto a EphB2 como diana terapéutica en el CCR²³⁴.

Sin embargo el estudio de Wu et al concluye que EphB2 influye en la progresión del cáncer de mama. Ellos observaron que el gen EphB2 se expresa en todos los tejidos sanos pero el 51% de los carcinomas de mama tienen mayor expresión del gen. EphB4 se expresa en la mayoría de las células endoteliales de tejido mamario sano y tumoral. Concluyen que la expresión de EphB2 se asocia negativamente con la SG y la SLE mientras que la expresión de EphB4 se correlaciona con el estadio y el grado histológico²⁴¹. En el cáncer de mama la sobre-expresión de EphB2 se ha correlacionado con una menor supervivencia²⁴¹. En tumores cerebrales, se observa una sobreexpresión en los gliomas al compararlo con un glioma de bajo grado y con un cerebro sano. In vitro la sobreexpresión promueve la migración y la invasión de células del glioma²⁹¹.

VIII.FACTORES PRONÓSTICO DEL CÁNCER COLORRECTAL

Características histológicas, moleculares y clínicas han sido estudiadas como factores pronóstico. El estadio patológico en el momento del diagnóstico es el mejor indicador del pronóstico a largo plazo ya que los factores pronósticos más significativos en el CCR son la presencia de metástasis, la extensión del tumor, el número de ganglios linfáticos afectados y la presencia de enfermedad residual. Características utilizadas en la clasificación del CCR por estadios.

Otros factores que no están incluidos en la clasificación TNM pero que tienen un papel como factores pronóstico independientes son: tipo histológico, el grado de diferenciación y el antígeno carcinoembrionario (CEA). En el futuro otros marcadores serán utilizados en la rutina para el pronóstico de CCR como son el gen DCC, el gen p53 o la MSI ²⁹². Actualmente se están investigando más factores pronóstico como el VEGF y EphB2.

Estos factores pronóstico los podemos clasificar en factores pronóstico clínicos, marcadores séricos y marcadores celulares y tisulares. (Tabla 7)

FACTORES PRONÓSTICO CLÍNICOS	FACTORES PRONÓSTICO SÉRICOS	FACTORES PRONÓSTICO CELULARES Y TISULARES
Tipo histológico	Lactato deshidrogenasa	18q/DCC
Estadio tumoral	Antígeno carcinoembrionario	K-ras
Grado de diferenciación celular	CA19.9	p53
Localización del tumor primario		Inestabilidad de microsatélites
		VEGF
		EphB2

Tabla 7. Clasificación de los factores pronóstico

VIII.A. Factores pronóstico clínicos

A.1. Tipo histológico

La comprensión del valor pronóstico del tipo histológico está obstaculizada por la falta de datos que definen la relación entre el tipo histológico, la extensión y las características genéticas del tumor. La mayoría de los tipos histológicos de CCR no son factores pronóstico independientes. Las excepciones son el carcinoma de célula en anillo y carcinoma de células pequeñas, que son factores pronóstico desfavorables, y el carcinoma medular que es un factor pronóstico favorable ²⁹³.

De entre todos los tipos histológicos el carcinoma mucinoso es el que ha mostrado más polémica. Algunos estudios han indicado que el adenocarcinoma mucinoso puede ser un factor de mal pronóstico ^{295, 295}. Otro estudio ha demostrado que el adenocarcinoma mucinoso puede ser un factor independiente de mal pronóstico sin embargo este estudio sólo contaba con pacientes con tumores que presentaban obstrucción en el intestino grueso, que es en si misma una característica pronóstica adversa ²⁹⁶.

A.2. Estadío tumoral

Hoy en día el factor pronóstico más utilizado es el estadío tumoral en el momento del diagnóstico²⁹⁷.

Para definir la extensión del tumor se utilizan dos clasificaciones la de Dukes y el sistema de estadiaje TNM del Comité Americano del Cáncer (AJCC).

La clasificación Dukes fue desarrollada para el cáncer rectal por Dukes en la década de los 30 (tabla 8). Después Astler-Coller la modificaron para tener un método organizado para clasificar la extensión de la enfermedad, tomar decisiones terapéuticas y estimar el pronóstico tanto en el cáncer de colon como en el rectal (tabla 9).

ESTADIO	DESCRIPCIÓN ANATOMOPATOLÓGICA
A	Tumor limitado a la mucosa y submucosa
B	Tumor que se extiende por la muscularis propia sin invasión ganglionar
C	Invasión ganglionar
D	Metástasis a distancia

Tabla 8. Clasificación Dukes

ESTADIO	DESCRIPCIÓN ANATOMOPATOLÓGICA
A	Tumor que infiltra la mucosa
B1	Tumor que se extiende a la muscularis propia pero no la atraviesa
B2	Tumor que penetra a través de la muscularis propia
C1	Tumor limitado a la pared intestinal con ganglios positivos
C2	Tumor que penetra en todas las capas con ganglios positivos
D	Metástasis a distancia

Tabla 9. Clasificación de Astler-Coller

Actualmente la clasificación TNM es la más utilizada para el CCR. Fue desarrollada por Pierre Denoix entre los años 1943 y 1952.

El sistema de clasificación de TNM describe la extensión anatómica de los tumores que no han sido tratados previamente. Se basa en el hecho de que la opción del tratamiento y la supervivencia están relacionadas con la extensión del tumor de la localización primaria (T), con la presencia o ausencia de tumor en los ganglios linfáticos regionales (N) y con la presencia o la ausencia de metástasis (M) ²⁹⁸. T se divide generalmente en cuatro mayores partes (T1-T4) (figura 13), expresando tamaño o la extensión cada vez mayor del tumor primario. N y M comprenden por lo menos dos categorías cada uno (0 y 1 indica la ausencia o la presencia de tumor, respectivamente) (tabla 10) ²⁹⁸.

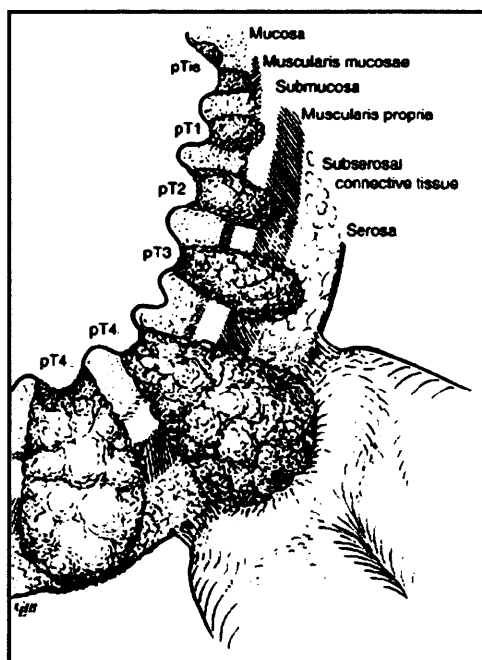


Figura 13. Subdivisiones de la categoría T de la clasificación TNM

TUMOR PRIMARIO	T _x	Tumor primario no evaluable
	T _{is}	Carcinoma in situ (intraepitelial o invasión de la lámina propia)
	T ₁	Tumor que invade la submucosa
	T ₂	Tumor que invade la muscularis propia
	T ₃	Tumor que invade la subserosa a través de la muscularis propia
	T ₄	Tumor que invade otros órganos y/o perfora el peritoneo visceral
GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES	N _x	No pueden evaluarse ganglios regionales
	N ₀	No hay afectación regional de ganglios linfáticos
	N ₁	Afectación de 1-3 ganglios linfáticos regionales
	N ₂	Afectación de 4 o más ganglios linfáticos regionales
METÁSTASIS A DISTANCIA	M _x	No se evalúan metástasis a distancia
	M ₀	No existen metástasis a distancia
	M ₁	Metástasis a distancia

Tabla 10. Clasificación TNM

Una vez que el paciente ha sido clasificado se realiza la agrupación por estadio expresado en números romanos desde el estadio 0 (estadio menos avanzado) al estadio IV (el más avanzado)²⁹⁹ (tabla 11).

ESTADIO	TNM	ASTLER-COLLER	DUKES
I	T ₁ N ₀ M ₀	A	A
	T ₂ N ₀ M ₀	B ₁	
II	T ₃ N ₀ M ₀	B ₂	B
	T ₄ N ₀ M ₀		
III	T ₁₋₄ N ₁ M ₀	C ₁ y C ₂	C
	T ₁₋₄ N ₂ M ₀		
IV	T ₁₋₄ N ₁₋₂ M ₁	D	D

Tabla 11. Relación entre estadios de las clasificaciones TNM, Astler-Coller y Dukes

La supervivencia es mayor en estadios más precoces que en estadios avanzados. En el estadio I y II la supervivencia a los 5 años es del 70-75%, en el III del 45-65% y en el estadio IV es menor al 3% ³⁰⁰.

A.3. Grado de diferenciación celular

La clasificación basada en el grado de diferenciación celular del carcinoma colorrectal es en parte subjetiva. La subjetividad y la imprecisión en la clasificación se pueden también relacionar un cierto grado con la heterogeneidad del tumor, ya que puede existir variación intratumoral de las características utilizadas para evaluar el grado de diferenciación celular ²⁹³. A pesar de esto se ha demostrado que es un factor pronóstico independiente.

En algunas clasificaciones el grado se define en base a una sola característica microscópica y otros sistemas incluyen una gran cantidad de características en la evaluación. Con independencia de la complejidad de los criterios la mayoría de los sistemas estratifican tumores en tres o cuatro grados como sigue:

- Grado 1: Tumores diferenciados.
- Grado 2: Tumores con una moderada diferenciación.
- Grado 3: Tumores mal diferenciados.
- Grado 4: Tumores no diferenciados.

Sin embargo en la mayoría de los estudios para poder realizar el análisis de datos agrupan estos cuatro grupos en dos:

- Bajo grado: Diferenciados y moderadamente diferenciados.
- Alto grado: Mal diferenciados e indiferenciados.

A pesar de estos problemas, varios estudios han demostrado que es un factor pronóstico independiente en el CCR. Investigaciones realizadas concluyen que el alto grado del tumor es un factor pronóstico adverso en comparación con el grado bajo ³⁰¹, ³⁰². Es decir que los tumores indiferenciados son factor pronóstico adverso ^{294, 295, 303}.

A.4. Localización del tumor primario

Los tumores localizados en la región rectosigmoide y en el recto tienen a los 5 años una tasa de supervivencia menor que aquellos que se localizan en regiones más proximales. Dentro del recto los cánceres distales tienen peor pronóstico que los de localizaciones más proximales ³⁰⁴.

VIII.B. Factores pronóstico séricos

Aunque la clasificación por estadios es un buen predictor del pronóstico no es suficiente ya que pacientes del mismo estadio e igual tipo histológico tienen un curso clínico de la enfermedad diferente. Las distintas características biológicas de las células tumorales lo explican. Por este motivo se han buscado otros factores pronóstico como son los séricos, los celulares y los tisulares para poder establecer un mejor pronóstico y así establecer estrategias terapéuticas individualizadas para obtener periodos mayores de SG y SLE.

B.1. Lactato deshidrogenasa

La lactato deshidrogenasa (LDH) es un enzima que contiene zinc y forma parte de la vía glucolítica, bajo condiciones anaerobias cataliza la transformación reversible

del piruvato a lactato. Es un tetrámero formado por dos subunidades activas (C y M) con peso molecular de 134 kDa³⁰⁵. Existen 5 isoenzimas, se sabe que a mayor número de subunidades M la LDH (la isoenzima LDH-5) es más eficiente en la catálisis de piruvato a lactato³⁰⁶. En estudios de inmunohistoquímica se observa que la LDH-1 se expresa tanto en células sanas como en tejido neoplásico³⁰⁷ mientras que la LDH-5 tiene mayor expresión en células cancerosas^{308, 309}.

Este enzima se encuentra presente en prácticamente todos los tejidos del cuerpo (en el citoplasma de sus células), por lo que puede elevarse en cualquier tumor y en una diversidad de patologías benignas (infarto agudo de miocardio, hepatitis, etc.)³¹⁰.

En los enfermos de cáncer con niveles elevados de LDH se observa una semana después de la cirugía un descenso rápido de su concentración lo que sugiere que el tumor sintetiza LDH³¹¹. El 50% de los tumores malignos, especialmente en estadios avanzados, tienen niveles elevados de LDH. En pacientes con cáncer una concentración elevada de LDH es factor de mal pronóstico³¹². Se relaciona fundamentalmente con la “carga tumoral” sin embargo tiene una baja especificidad y sensibilidad³¹⁰. Niveles elevados de LDH se correlacionan con fracaso de la radioterapia y/o quimioterapia en varios cánceres, como en CCR^{313, 314}, linfomas o sarcomas³⁰⁶.

La isoenzima LDH- 5 se asocia con metástasis en el CCR³⁰⁶.

B.2. Antígeno carcinoembrionario

El CEA es una glicoproteína de 200kDa. Se eleva en el CCR, cáncer de mama, pulmón, hígado o páncreas.

No es un marcador útil para el diagnóstico de CCR primario por su baja sensibilidad, además sus valores se superponen entre las enfermedades malignas y benignas ³¹⁵⁻³¹⁹.

Por estas razones el Grupo Europeo de Marcadores Tumorales y la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) recomiendan que el CEA no se utilice para el cribado del CCR ^{316, 320}.

ASCO recomienda determinar los niveles de CEA antes de la operación ya que son útiles para clasificar el tumor, establecer el pronóstico y para tomar las decisiones terapéuticas. Además se recomienda medir la concentración de CEA antes y después de la operación por dos motivos: el primero es porque la normalización de sus niveles tras la operación se correlaciona con una resección completa del tumor, es más los niveles elevados indican enfermedad residual. El segundo motivo es que concentraciones preoperatorias elevadas son indicadoras de mal pronóstico, numerosos estudios lo confirman ³²¹⁻³²⁷. Los pacientes con niveles de CEA superiores a 5ng/l tienen peor pronóstico que los enfermos con niveles menores ²⁹⁶. En un estudio realizado por Wiratkapun et al encuentran en el 37% de los pacientes una asociación entre niveles elevados de CEA y futuras metástasis a los 5 años contra el 7,5% de los pacientes con concentraciones normales ³²⁸.

B.3. CA19.9

Es un antígeno polisacárido relacionado con el grupo sanguíneo Lewis. Su concentración está aumentada en el cáncer de páncreas, en el hepatobiliar, gástrico, CCR pero también en enfermedades benignas como la pancreatitis.

Es un marcador menos sensible que el CEA para el CCR ^{329, 330}. Por este motivo su análisis no es útil ni en el cribado de CCR ²⁵⁸⁻²⁶⁰ ni en el diagnóstico de CCR primario ^{316, 331}. Tanto el Grupo Europeo de Marcadores Tumorales como ASCO apoyan esta decisión ^{316, 320}.

Hay estudios que lo relacionan con el pronóstico ^{325, 332}. Concentraciones elevadas de CA19.9 se asocian con peor pronóstico ³²³⁻³²⁷. A pesar de ello la ASCO no recomienda su determinación ni para el diagnóstico, estadificación, seguimiento o monitorización del tratamiento de CCR ³³³.

VIII.C. Factores pronóstico celulares y tisulares

Como he mencionado antes, a pesar de que el estadio tumoral es el factor pronóstico más importante, pacientes del mismo estadio tienen distinta supervivencia. Para individualizar el pronóstico y el tratamiento se están estudiando distintos marcadores moleculares del tumor, algunos de ellos ya han sido identificados como posibles marcadores con significación clínica.

La mayor parte de los estudios son retrospectivos o pequeñas investigaciones, la interpretación de sus datos es compleja debido a la heterogeneidad de terapias adyuvantes, a la falta de estandarización o al control de calidad de las técnicas del laboratorio ²⁹³. Incluso existe una gran variabilidad en los métodos de detección. Por ejemplo el gen más estudiado en el CCR es el p53 y se puede analizar por la LOH, por demostración inmunohistoquímica de la sobreexpresión de su proteína y/o por detección de mutaciones por secuenciación.



C.1. 18q/DCC

La pérdida alélica de una región en el brazo corto del cromosoma 18 ocurre con frecuencia en el carcinoma colorrectal. Esta región contiene varios genes supresores del tumor, el más conocido es el gen del DCC.

La LOH en el brazo corto del cromosoma 18 se relaciona con pronóstico adverso, el motivo es la pérdida de genes supresores del tumor que se encuentran localizados en esa región³³⁴. En algunos estudios, la LOH en esta región del cromosoma y la falta de expresión de su proteína representa un factor pronóstico adverso para el carcinoma colorrectal del estadio II porque se comportan como pacientes del estadio III³³⁵⁻³³⁶. En cambio, los pacientes de la etapa II sin LOH 18q se comportan como pacientes de la etapa I³³⁷. LOH 18q y la pérdida de expresión del DCC también se asocian con metástasis hepáticas³³⁸. En base a estas observaciones se pueden dividir a los pacientes en dos grupos, uno con buen pronóstico y otro con peor pronóstico incluso estratificarlos en distintos grupos terapéuticos con el objetivo de proporcionarles un tratamiento individualizado.

La LOH en el brazo corto del cromosoma 18 se ha relacionado con una SG y SLE menor^{337, 339}. Así lo demuestran Jen et al en su estudio realizado con pacientes en estadio II de CCR, los pacientes sin la alteración mostraron una supervivencia a los 5 años del 93% sin embargo era del 54% en los que tenían la anomalía genética³³⁷. Este hallazgo sugiere que los pacientes en estadio II con una delección en el cromosoma 18q tienen un curso clínico de la enfermedad más agresivo y podrán subagruparse para que se beneficien de una quimioterapia adyuvante. Los resultados siguen siendo polémicos debido a estudios que no confirman estas hipótesis³⁴⁰⁻³⁴².

La expresión del DCC es un predictor de la supervivencia en CCR en estadio II y III. Los pacientes en estadio II que expresan la proteína del DCC tienen una tasa de supervivencia a los cinco años de 94,3%, mientras que los pacientes que no la expresan tienen una tasa de supervivencia de 61,6% ($p < 0,001$)³⁴³. En pacientes en estadio III, las tasas de supervivencia respectivas son 59,3% y 33,2% ($p < 0,003$)³⁴³. Sin embargo estos datos no han sido confirmados por otros estudios^{340, 342}.

C.2. K-ras

Las mutaciones en el oncogen K-ras se asocian con mayor grado de invasión tumoral³⁴⁴ y con un peor pronóstico³⁴⁵⁻³⁴⁷ sin embargo otros estudios no lo confirman³⁴⁸.

El estudio multicéntrico RASCAL con 2721 pacientes de 22 grupos de 13 países no pudo mostrar una asociación entre la presencia o la ausencia de mutaciones en K-ras y la clasificación de Dukes. El análisis multivariante sugirió que la presencia de una mutación aumentaría el riesgo de recurrencia y de muerte; particularmente cualquier mutación de guanina a timina pero no de guanina a adenina o a citosina aumenta el riesgo de recurrencia y de muerte³⁴⁹. Otro estudio encuentra que el 25% de tumores no recurrentes y que el 71% de los tumores recurrentes presentan mutaciones en los codones 12 y 13 de K-ras. Además, se observa una tasa más alta de mutación (el 65%) en tumores con metástasis linfáticas o hematógenas comparadas con aquellos que no las tienen³⁴⁶. Sin embargo en un estudio realizado por Andreyev et al en el que analizan mutaciones individuales observaron que sólo las mutaciones en el codón 12 se correlacionan con un riesgo creciente de recurrencia y de muerte³⁴⁹.

Sólo el 28% de los carcinomas limitados a la muscularis propia (Tis, T1, y T2) contienen anomalías en este gen comparado con el 41% de tumores más invasores (T3 y T4) ³⁴⁶.

Actualmente varios estudios demuestran que la presencia de anomalías en el gen K-ras predice la respuesta al tratamiento, estos hallazgos permitirán individualizar la terapia ^{347, 350}.

Estudios recientes han demostrado que la eficacia terapéutica de Cetuximab depende de la presencia o ausencia de mutaciones en el gen K-ras. Lievre et al fueron los primeros en demostrar que las mutaciones en K-ras en pacientes con CCR son predictores de resistencia al tratamiento con Cetuximab y por tanto se asocian con un peor pronóstico ³⁵¹.

C.3. p53

A pesar de los estudios aun hay controversia sobre el valor pronóstico de la sobreexpresión de p53. Algunos estudios lo relacionan con un peor pronóstico ³⁵²⁻³⁵⁴, otros encuentran la relación contraria ³⁵⁵ y otros no encuentran relación ²⁵⁶⁻³⁵⁷.

Estudios que analizan la mutación de p53 por secuenciación muestran un periodo de supervivencia significativamente menor en los individuos con mutación en p53 ³⁵⁸.

Las anomalías en el gen p53 se asocian con las etapas más avanzadas de la neoplasia colorrectal sugiriendo que las mutaciones en p53 son responsables de la agresividad del tumor. La LOH en el brazo largo del cromosoma 17 se relaciona con la invasión de los vasos sanguíneos, invasión linfática o con la metástasis ³⁵⁹ y con menor supervivencia ^{340, 360}.

Algunos estudios concluyen que las mutaciones en los distintos exones se relacionan con fenotipos diferentes y que este sería el motivo por el que pacientes del mismo estadio y tipo histológico evolucionan de modos diferentes³⁶¹.

Por otro lado la utilidad de la sobreexpresión de la proteína p53 es ambigua. Unos estudios relacionan la sobreexpresión de p53 con un estadio más avanzado (estadios C y D de Dukes) y mayor tasa de incidencia de metástasis hepáticas^{362, 363}. En cambio, otros estudios no pudieron mostrar una relación entre la expresión p53, los estadios de Dukes, o el pronóstico^{364, 365}. Ésto puede ser debido a la variabilidad metodológica existente ya que en la actualidad no hay ninguna técnica estandarizada.

C.4. Inestabilidad de los microsatélites

La presencia de MSI es un factor predictor de la supervivencia en HNPCC y en el CCR esporádico. Además se ha relacionado con el tratamiento.

Varios estudios demuestran una mayor supervivencia^{173, 366-368} y un curso clínico del CCR menos agresivo en los pacientes que muestran MSI-H^{169, 173}.

Aun continua siendo desconocido el mecanismo por el que los tumores con MSI-H tienen una mayor supervivencia. Sin embargo las bases biológicas son paradójicas puesto que estos tumores están poco diferenciados³⁶⁹.

A pesar de ser un marcador de buen pronóstico, la mayoría de los estudios han sugerido que los CCR con MSI-H responden peor a la quimioterapia que los tumores MSS³⁵⁶.

C.5. VEGF

VEGF se expresa en distintos tipos de tumor (pulmón, mama, colon,...), las células neoplásicas expresan mayor cantidad de VEGF que las endoteliales ²⁰⁹.

Debido a su participación en la angiogenesis el aumento de su expresión se correlaciona con el desarrollo tumoral, tamaño del tumor, con la formación de metástasis y con el pronóstico, tanto en tumores sólidos como en hematológicos ²²⁸. La sobreexpresión de ARN mensajero del VEGF y de su proteína se ha asociado con la progresión tumoral y un peor pronóstico en varias neoplasias (melanoma, ovario, próstata, colon) ³⁷⁰. Concentraciones preoperatorias elevadas de VEGF se asocian con peor pronóstico ²³⁰.

Se ha demostrado que los SNPs en el gen VEGF producen cambios en su expresión, producción y concentración de VEGF. Además pueden influenciar el proceso de la angiogenesis y relacionarse con una variación intraindividual del riesgo y progreso de tumores y con la resistencia a tratamientos ²²⁰.

Un meta-análisis de 27 estudios demuestra que la sobreexpresión del gen VEGF se relaciona significativamente con una menor SG y con un aumento del riesgo de recaída ³⁷¹. Además es predictor del riesgo de metástasis ³⁷² y factor predictivo de la respuesta al tratamiento ^{373, 374}.

C.6. EphB2

Los receptores EphB pertenecen a la familia de receptores tirosinquinasa. Estos receptores y sus ligandos son componentes de las vías de señalización implicadas en el desarrollo, ya que están implicados en la adhesión celular, migración y posición de las

células. EphB2 regula la organización del citoesqueleto y la migración celular en varios tipos celulares como son: neuronas, células endoteliales y enterocitos³⁷⁵.

Como hemos dicho anteriormente es considerado un gen supresor^{235, 278}. En el CCR se ha observado la pérdida de expresión de EphB2 y ésta se asocia con la progresión tumoral^{290, 376}, se asocia con un peor pronóstico^{272, 284, 290}. Tanto cambios genéticos como epigenéticos pueden provocar la inactivación del gen, incluyendo la LOH^{276,277}, la metilación de islas CpG del promotor del gen EphB2^{278, 279} así como mutaciones en la región 9A del exón 17 de este gen²⁷⁸.

En un estudio realizado por Alazzouzi et al en CCR se describió que la inactivación de EphB2 acelera la tumorigenesis: altos niveles de este receptor se expresan en lesiones premalignas pero su expresión descendía en los CCR. Observaron que el 21% (6/29) de los adenomas con MSI presentaban mutaciones en la región 9A del exón 17 y también el 41% (101/246) de los CCR con MSI. Estas mutaciones pueden provocar la extensión de la proteína o producir proteínas truncadas²⁷⁸.

- OBJETIVOS -

1. Determinar los polimorfismos de gen VEGF en pacientes diagnosticados de CCR.
2. Analizar la presencia de delección en la región 9A de exón 17 del gen EphB2 en pacientes diagnosticados de CCR.
3. Estudiar la relación entre los polimorfismos del gen VEGF y las variables clínico-patológicas y la relación entre presencia de delección en la región 9A de exón 17 del gen EphB2 y las variables clínico-patológicas.
4. Conocer el valor pronóstico de los polimorfismos del VEGF en relación a la SG y SLE.
5. Conocer el valor pronóstico de delección en la región 9A del gen EphB2 en relación a la SG y SLE.
6. Averiguar si estos polimorfismos y/o delección en la región 9A del gen EphB2 son marcadores pronóstico independientes en el CCR.

-PACIENTES Y MÉTODO-

I. PACIENTES

Se ha realizado un estudio de cohortes prospectivo con una población de 345 pacientes tratados en el Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo II del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Todos ellos fueron intervenidos por CCR. El servicio de Anatomía Patológica confirmó el diagnóstico a través del análisis histológico de la pieza de resección obtenida en la operación.

Además ninguno de ellos recibió terapia neoadyuvante. Los pacientes con carcinomas metacrónicos, pacientes con criterios de HNPCC, las poliposis familiares y la enfermedad inflamatoria intestinal fueron excluidos del estudio.

La investigación se realizó entre marzo de 1995 y noviembre de 2009. Las intervenciones quirúrgicas fueron realizadas entre marzo de 1995 y abril de 2003. El periodo de seguimiento se realizó hasta noviembre de 2009.

El Comité de ética e investigación clínica del Hospital Clínico San Carlos aprobó este estudio. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado antes de comenzar la investigación.

II. MÉTODO

II.A. Metodología clínica

Esta investigación consta de tres etapas: preoperatoria, operatoria y postoperatoria.

A.1. Etapa preoperatoria

A todos los pacientes se les realizó una historia clínica detallada. Además de determinaciones analíticas básicas, estudios de radiología y un estudio endoscópico con la biopsia correspondiente. Todos los pacientes fueron diagnosticados de CCR.

A.2. Etapa operatoria

A todos los pacientes se les realizó una cirugía radical oncológica en función de la localización del tumor. El mismo cirujano realizó todas estas intervenciones quirúrgicas. La operación fue considerada curativa si después de la resección no había ninguna evidencia de tumor macroscópico residual.

Se obtuvieron dos muestras del tumor inmediatamente después de extraerlo: una de la zona macroscópicamente afectada y otra muestra de una zona alejada por lo menos 10 cm de la periferia del tumor, para asegurarnos que se trataba de tejido sano de la mucosa colorrectal. A continuación las muestras se lavaron con abundante suero fisiológico para eliminar restos de sangre y grasa.

Cada muestra fue dividida en dos. En una muestra tumoral y otra no tumoral se realizó un estudio histopatológico. En las otras muestras se analizaron los polimorfismos del VEGF y la mutación del gen EphB2.

Hasta que fueron analizadas, cada muestra fue introducida en un tubo previamente identificado. Estos tubos se congelaron en un termo con nitrógeno líquido. A continuación se transportaron y almacenaron en un congelador a -80°C.

Al Servicio de Anatomía Patológica se le remitió el tumor para su valoración.

A.3. Etapa postoperatoria

El seguimiento clínico de los pacientes y su estudio se realizó según el protocolo establecido por el cirujano que les intervino. La valoración de la recidiva locorregional, metástasis a distancia y la presencia de tumores metacrónicos estaba incluida en dicho protocolo.

II.B. Metodología analítica

Previo al estudio de los polimorfismos del gen VEGF y de la mutación EphB2 de cada paciente fue necesario la extracción y cuantificación del ADN en la muestra de tejido tumoral o no tumoral.

B.1. Extracción y cuantificación del ADN

1. EXTRACCIÓN DEL ADN

El ADN genómico se extrajo de las muestras tisulares tumorales y no tumorales. Se utilizó el kit de extracción de ADN de Roche que se basa en el método de extracción de ADN con fenol/cloroformo.

El primer paso del protocolo consiste en homogenizar 25mg de tejido (cortado en pequeñas piezas) en 180µl de tampón de lisis frío. Seguidamente se añaden 20µl de proteinasa K y se incuba a 56°C durante toda la noche. Los pasos siguientes consisten

en la adición de fenol/cloroformo y centrifugación. Por último se precipita el ADN con etanol y se rehidrata en 200 µl de tampón para cuantificarlo y almacenarlo.

2. CUANTIFICACIÓN DEL ADN

El ADN genómico extraído se cuantificó por espectrofotometría y se diluyó hasta alcanzar la concentración necesaria para realizar el estudio de la alteración genética.

Esta cuantificación por espectrofotometría está basada en la propiedad de las bases púricas y pirimidínicas de absorber a una longitud de onda de 260nm (D260). Una unidad de absorbancia a 260nm se corresponde con una concentración de ADN de 50 µg/ml. Por tanto la concentración de ADN genómico extraído ([ADN]) será: $[ADN] = D260 \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{factor de dilución}$.

Se debe medir la pureza del ADN extraído ya que durante su extracción puede producirse una contaminación proteica. Para ello es necesario medir nuestra muestra por segunda vez, pero esta vez medimos las unidades absorbidas a 280nm, ya que es la longitud de onda a la que absorben las proteínas. Un ADN es puro cuando la relación entre la absorbancia D260 y D280 está comprendida entre 1,8 y 2.

Una vez conocida su concentración, siempre y cuando tenga una buena pureza, se alícuota el DNA genómico extraído en tubos correctamente identificados y se guardan a -20°C hasta la realización de su análisis.

B.2. Estudio de las alteraciones genéticas

1. DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN VEGF

La detección de los polimorfismos -2578 C/A, -1154 G/A y +936 C/T se realizó mediante la amplificación de cada secuencia con el ADN extraído de las muestras de tejido tumoral o no tumoral de cada paciente a través de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real combinado con un análisis de la curva de crecimiento exponencial del amplificado. Se utilizaron cebadores y sondas específicas para la detección de los tres polimorfismos en un sistema de Smart Cycler de Cepheid. Las tablas 12, 13 y 14 muestran las secuencias de los cebadores y de las sondas utilizadas. Las sondas estaban marcadas con una molécula fluorescente, la sonda normal con FAM y la mutada con TET. Gracias a la emisión de estos fluorocromos podemos detectar las curvas de crecimiento exponencial de cada amplificado.

POLIMORFISMO -2578 C/A	
Cebador sense	5' CCA CAG AGG CTA TGC CAG CTG TA 3'
Cebador antisense	5' GGT TTC TGA CCT GGC TAT TTC CA 3'
Sonda normal	FAM- ACC CAG ATC GTG CCA G-MGB-NFQ
Sonda mutada	TET- CAC CCA GAT CTT GCC AG-MGB-NFQ

Tabla 12 Secuencias de cebadores y sondas del polimorfismo -2578 C/A

POLIMORFISMO -1154 G/A	
Cebador sense	5'CGG GCC AGG CTT CAC T 3'
Cebador antisense	5' CCG CTA CCA GCC GAC TTT TAA 3'
Sonda normal	FAM- CTC AGC CCC TCC ACA C-MGB-NFQ
Sonda mutada	TET- CCT CAG CCC TTC CAC AC-MGB-NFQ

Tabla 13 Secuencias de cebadores y sondas del polimorfismo -1154 G/A

POLIMORFISMO +936 C/T	
Cebador sense	5' ACT CCG GCG GAA GCA TTC 3'
Cebador antisense	5' AGC AAG AAA AAT AAA ATG GCG AAT CCA
Sonda normal	FAM- CAA GAG GGA CCG TGC TG-NFQ
Sonda mutada	TET- AAG AGG GAC CAT GCT G-MGB-NFQ

Tabla 14 Secuencias de cebadores y sondas del polimorfismo +936 C/T

La mezcla de la PCR a tiempo real contiene 12,5µl de la enzima master de Applied Biosystems Taqman Universal PCR Master Mix, 2,5µl de cada cebador con (sense y antisense) una concentración de 10µM, 0,5µl de cada sonda (normal y mutada) una concentración de 10µM y 30ng del DNA de cada paciente y la cantidad de agua necesaria para obtener un volumen final de 25µl.

El programa de amplificación para el análisis de los polimorfismos -2578 C/A y +936 C/T consistió en una desnaturalización inicial de 15 minutos a 95°C. A continuación se realizaron 45 ciclos, cada uno de ellos consistía en una desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y en la hibridación de los cebadores con sus secuencias específicas del DNA a amplificar y síntesis de esta secuencia a 60°C durante 60 segundos en el Smart Cycler.

El programa de amplificación para el análisis del polimorfismo -1154G/A consistió en una desnaturalización inicial de 15 minutos a 95°C seguida por 50 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, hibridación de los cebadores a 62°C durante 60 segundos y extensión a 72°C durante 60 segundos.

En los polimorfismos VEGF -2578 C/A y del +936 C/T la temperatura de fusión (T_m) del cebador sense es de 62,53 y la del cebador antisense es de 64,78.

La Tm del cebador sense en el polimorfismo VEGF -1154G/A es de 56,0 y para el cebador antisense es de 61,0.

Para saber si se había amplificado correctamente en cada amplificación se incorporaban dos controles, uno negativo y otro positivo. El control negativo tenía todos los reactivos de la mezcla, la única diferencia era que en vez de DNA de un paciente tenía agua destilada, así podíamos excluir la contaminación de los reactivos. La mezcla del control positivo contenía un DNA cuyo polimorfismo del gen VEGF era conocido.

Una vez completado el programa de amplificación se procedió a analizar las curvas de crecimiento exponencial de cada amplificado.

En el polimorfismo +936 C/T el paciente homocigoto normal es decir CC muestra con el fluorocromo FAM una curva de crecimiento alta y temprana, sin embargo con el TET la curva es baja y tardía. En el homocigoto mutado es decir TT la curva con el fluorocromo FAM es baja y tardía y al revés con el fluorocromo TET. El heterocigoto muestra curvas intermedias a las anteriores.

En el polimorfismo -2578 C/A, el individuo CC es decir homocigoto normal tiene una curva con el fluorocromo FAM alta y de inicio temprano con el TET ocurre lo contrario. El homocigoto mutado (AA) muestra una curva baja y tardía con FAM pero con TET es alta y temprana. El paciente CA, es decir heterocigoto muestra curvas intermedias con ambos fluorocromos.

En el polimorfismo -1154 G/A, el paciente GG, homocigoto normal, muestra curvas con el fluorocromo FAM altas y de inicio temprano sin embargo con TET la curva es la contraria. El homocigoto mutado muestra una curva baja y tardía con TET sin embargo es al revés con FAM. El paciente GA (heterocigoto) muestra curvas de crecimiento intermedias con los dos fluorocromos.

2. DETERMINACIÓN DE LA MUTACIÓN DEL GEN EPHB2

La detección de la delección en la región 9A del gen EphB2 se realizó mediante la amplificación de la secuencia con el ADN extraído de las muestras de tejido tumoral o no tumoral de cada paciente a través de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y una posterior visualización y análisis del tamaño de cada amplificado utilizando el secuenciador ABI 310 PRISM (Applied Biosystems) y el software Genescan y Genotyper (Applied Biosystems).

2.1. Amplificación

La amplificación de la secuencia que contiene la región 9 A del gen EphB2 se realizó con el ADN de las muestras tumorales y no tumorales en un volumen final de 25 μ l que contenía: 100 ng de ADN genómico, 2,5 μ l de tampón estándar para PCR, 2 mM de $MgCl_2$, 350nM de cada uno de los cebadores (tabla 15), 200 μ M de dNTPs y 2 U de Taq ADN polimerasa. La banda con sentido de cada uno de los cebadores contenía un fluorocromo (FAM) en el extremo 5' que permitía la identificación de la secuencia.

Sense 5'-3'	FAM- GTC ACG TGA CAC AGT CAA AC
Antisense 3'-5'	TTT GCT CCT GCC AGA GGT T

Tabla 15. Secuencias de los cebadores utilizados en la amplificación de la secuencia que contiene la región 9 A del gen EphB2 mediante PCR.

Realizamos la amplificación en un termociclador Perkin Elmer, este programa de amplificación consistió en un ciclo inicial de 95 °C para desnaturalizar el ADN seguido de 35 ciclos compuesto cada uno de ellos de: 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 56°C (es la temperatura de hibridación de cada uno de los cebadores utilizados para la

amplificación) y 30 segundos a 72 °C (para la síntesis de la secuencia de ADN). Finalmente se realiza un ciclo a 72 °C durante 7 minutos (para la elongación final).

Para evaluar una posible contaminación de los reactivos en cada amplificación se incluyó un control negativo. Éste contiene todos los reactivos de la mezcla de amplificación excepto el ADN que fue sustituido por agua destilada.

2.2. Electroforesis

Antes de realizar el análisis de los amplificados es necesario comprobar que no existe contaminación y que sus tamaños son los adecuados, para ello separamos los amplificados mediante la técnica de electroforesis.

Los amplificados se separaron en geles de agarosa al 2% (permite la separación de fragmentos de ADN entre 100-2000 bp). Cada gel fue hecho con 27 ml de agua destilada, 3 ml de tris-acetato EDTA (TAE) 10X y 0,6 gramos de agarosa, esta mezcla se llevo a ebullición e inmediatamente después se le añadió 3 µl de bromuro de etidio (permite visualizar los fragmentos de ADN cuando se expone el gel a radiación ultravioleta ya que el bromuro de etidio es un compuesto que se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN). A continuación vertemos la mezcla en un soporte hasta su gelificación a temperatura ambiente.

Una vez que tenemos el gel, preparamos las muestras: cada una de ellas está compuesta por 10µl del amplificado y 2 µl de azul de bromofenol, el blanco es aquel que tiene el amplificado del control negativo. Además preparamos un marcador para saber si los fragmentos amplificados tienen el tamaño adecuado y no existe contaminación, para ello mezclamos 10 µl de agua destilada, 2 µl de azul de bromofenol y 2 µl de marcador de peso molecular que muestra 17 fragmentos de entre 19 y 1114 pb

(ADN Molecular Weight Marker VIII). El azul de bromofenol nos muestra el final de la electroforesis.

El paso siguiente consiste en introducir el gel en la cámara de electroforesis y rellenarla con solución amortiguadora (TAE 1X). Cargamos las muestras en el gel en el siguiente orden: el blanco, las muestras tumorales y no tumorales y el marcador.

A continuación cubrimos el gel en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 30 minutos. Después revelamos el gel que consiste en su exposición a radiación de luz ultravioleta de este modo podemos observar los amplificadores como bandas blancas.

2.3. Análisis de la mutación del gen EphB2

Para detectar la delección en la región 9A del gen EphB2 evaluamos el tamaño de cada amplificado utilizando un secuenciador ABI 310 PRISM y el software Genescan y Genotyper (Applied Biosystems).

El cebador correspondiente a la banda con sentido se marcó con una molécula fluorescente (FAM) en el extremo 5' para poder identificar posteriormente los productos amplificados mediante electroforesis capilar.

La muestra de cada amplificado se preparó con 3 µl del amplificado, 0,3 µl de marcador interno ROX (Applied Biosystem/Abi Prism) y 18 µl de formamida desionizada. Cada una de estas muestras se sometió a un proceso de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos. Los fragmentos fueron separados por electroforesis capilar en el analizador genético ABI 310 PRISM (Applied Biosystems). El software Genescan y Genotyper (Applied Biosystems) nos permitió visualizar y analizar las señales fluorescentes correspondientes a los amplificadores de diferentes tamaños.

Todas las muestras deleccionadas se confirmaron por secuenciación.

2.4. Secuenciación

Realizamos la misma amplificación anterior salvo que utilizamos cebadores sin marcar. Al igual que en el caso anterior comprobamos la amplificación en gel de agarosa.

A continuación amplificamos de nuevo estos amplificados con el kit de dNTP (dRhodamine Applied Biosystem) de este modo marcamos los amplificados para la secuenciación. Cada muestra la preparamos del siguiente modo: 4µl de premix, 5 µl de producto amplificado diluido a 1/2 y 1µl de cebador. El programa de amplificación para la secuenciación consiste en un primer ciclo de 94°C durante 3 minutos, a continuación se realizan 35 ciclos cada uno de ellos compuesto por: 30 segundos a 96°C, 15 segundos a 60°C y 4 minutos a 60°C.

El paso siguiente consiste en purificar los amplificados: en un eppendorf de 1,5ml añadimos: 19 µl de MgCl₂ 2mM, 55 µl de etanol al 95% y 20 µl de la reacción de secuenciación. Esta mezcla la dejamos 15 minutos a temperatura ambiente, a continuación la centrifugamos a 14000 r.p.m. durante 15 minutos. Después eliminamos la solución de etanol y lavamos el "pellet" con 250 µl de etanol al 75% y volvemos a centrifugar durante 10 minutos a 14000 r.p.m., eliminamos la solución de etanol y dejamos secar el "pellet". Volvemos a repetir el paso del lavado para después dejarlo secar al aire. Una vez seco añadimos 30 µl de formamida ionizada al "pellet" y lo resuspendemos. Esta mezcla la dejamos a temperatura ambiente 15 minutos y después a 37°C otros 15 minutos. Cada una de estas muestras se desnaturalizó a 94°C durante 3 minutos y se secuenció en un secuenciador ABI 31PRISM (Applied Biosystems).

III. C. Metodología estadística

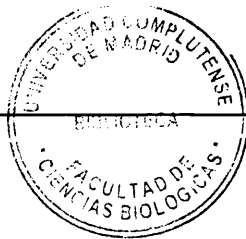
Hemos hecho un estudio de cohortes prospectivo.

Son variables cualitativas todas menos la edad y los tiempos. Las variables cuantitativas se muestran con su media y desviación estándar (DE). Las variables cualitativas las mostramos con su distribución de frecuencias. Mostramos la media y el rango intercuartílico en las distribuciones asimétricas. La variable edad la recodificamos en dos grupos de acuerdo a su mediana (71 años).

El test χ^2 lo utilizamos para evaluar la relación entre las características clínico-patológicas, los factores pronóstico clásicos, los polimorfismos del gen VEGF y la presencia/ausencia de delección en la región 9A del exón 17 del gen EphB2. Utilizamos la prueba exacta de Fisher en aquellos casos en los que un 25 % o más de los esperados fueran menores de 5.

Estudiamos con el test de la t de Student (en comparaciones de una variable con dos categorías) y/o con el análisis de la varianza (ANOVA) (más de dos medias) el comportamiento de las variables cuantitativas por cada variable independiente categorizada. En todos los casos se comprobó la distribución de la variable frente a los modelos teóricos y se contrastó la hipótesis de homogeneidad de variancias. Se corrigió el nivel de significación para contrastes múltiples con el test de Bonferroni.

Para el estudio de la SG solo consideramos aquellos pacientes que fallecieron como consecuencia del CCR, es decir excluimos los enfermos vivos y los fallecidos por otra causa. La SG es el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la del fallecimiento o última revisión. Para el análisis de la SLE consideramos aquellos pacientes intervenidos con intención curativa que han sufrido una recurrencia de la



enfermedad (ya sea locorregional o a distancia). La SLE es el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la de diagnóstico de la primera recidiva.

La SG y la SLE respecto a las variables clínico-patológicas, los factores pronóstico clásicos, los polimorfismos del gen VEGF y la delección en el gen EphB2 las analizamos con el método de Kaplan-Meier. (Representamos las gráficas de las curvas estimadas para cada caso).

Con el test exacto de Breslow comparamos las funciones de supervivencia de los distintos subgrupos. Este test compara el número de eventos observados en cada uno de los subgrupos con el número de eventos esperados en el caso de que la distribución de la variable dependiente fuera la misma en todas las categorías (hipótesis nula).

La relación entre los polimorfismos y los eventos y entre la delección en el gen EphB2 y los eventos se estudió mediante un análisis estratificado, con el objetivo de detectar interacción y confusión con las variables clínicas.

Con el modelo de riesgos proporcionales de Cox identificamos y evaluamos la relación entre los polimorfismos del gen VEGF y la SG y SLE y la relación entre la delección en el gen EphB2 y SG y SLE. Mostramos la hazard ratio (HR) y su IC del 95%.

$$h(t; \mathbf{X}) = h_0(t) \cdot e^{\beta \cdot \mathbf{X}} = h_0(t) \cdot e^{\beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \beta_3 \cdot x_3 + \dots + \beta_p \cdot x_p}$$

$h(t; \mathbf{X})$: es la tasa de riesgo de un sujeto, con valores $\mathbf{X}=(x_1; x_2; \dots; x_p)$ en las variables explicativas, en el instante t . Es la variable respuesta que se modeliza. Representa en el instante t el riesgo de muerte o de recidiva de los sujetos que tienen un determinado patrón de valores x en las variables explicativas.

$e^{\beta'X}$: es la función exponencial, su exponente es la combinación lineal, sin término constante, de las p variables explicativas X_i .

$h_0(t)$: Es la función de riesgo de referencia (“baseline” o “underlying hazard function”), sólo depende del tiempo, representa las tasas instantáneas de riesgo de un sujeto hipotético con valor 0 en todas las variables predictivas.

La existencia de interacciones fue estudiada, para ello introducimos las variables independientes multiplicativas con pruebas de significación estadística y se mantienen en el modelo los términos de interacción estadísticamente significativos. Mostramos los “razones de tasas” ajustados junto a sus IC al 95%. Un parámetro β con signo positivo indica un peor pronóstico del sujeto para un valor alto de la variable x ya que indica un aumento de la tasa instantánea de riesgo. Sin embargo un parámetro β con signo negativo indica mejor pronóstico para un valor alto en la variable x . El exponente $e^{\beta x}$ muestra la contribución de una variable x , es el factor por el cual se multiplica la tasa de riesgo instantáneo de un sujeto cuando la variable x se incrementa en una unidad. Este exponente se interpreta como el riesgo relativo en el instante t de los sujetos. En variables dicotómicas es pasar de la ausencia (0) a la presencia (1) del factor x . En variables cuantitativas es el incremento lineal de la tasa de riesgo cuando se incrementa la variable x en una unidad. Este aumento es proporcional en todos los valores que toma la variable. En variables policotómicas (más de dos categorías) una categoría se toma como referencia y por lo tanto el RT es de 1. El resto de las categorías se comparan frente a la de referencia.

Los supuestos básicos que deben de cumplir los datos para poder aplicar dicho modelo son sobre todo de la parte paramétrica ya que la contribución de las diferentes variables explicativas en la predicción de la supervivencia o de la tasa instantánea de

riesgo, es la misma en cualquier momento de tiempo de seguimiento. La parte no paramétrica del modelo no impone ningún supuesto sobre la forma de distribución de los tiempos de supervivencia. Se han comprobado los supuestos del modelo.

Rechazamos la hipótesis nula de todos los contrastes de hipótesis con un error de tipo I menor de 0,05.

Este análisis estadístico se realizó con el paquete informático SPSS para Windows versión 12.0.

-RESULTADOS-

I. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

Nuestro estudio se ha realizado con una población de 345 pacientes diagnosticados de CCR esporádico, de los cuales 184 son hombres (53,3%) y 161 son mujeres (46,7%), con una media de edad de 69,89 años, una desviación típica de 11,19 y una mediana de edad de 71 años (rango intercuartílico $P_{25} = 62$ y $P_{75} = 78$).

I.A. Características de los tumores

A.1 Localización

En el colon se localizan 206 tumores (59,7%) y en el recto 139 (40,3%). Respecto a los localizados en el colon: el 24,6% están situados en el colon derecho, el 5,6% en el transversal, 4,6% en el colon izquierdo y 24,9% están localizados en sigma (gráfico 6).

A.2 Tipo histológico

Teniendo en cuenta la clasificación histológica de la OMS ³⁷⁷ la distribución de los CCR es: 317 adenocarcinomas (91,9%) y 28 adenocarcinomas mucinosos (8,1%) (gráfico 7).

A.3. Estadio tumoral

Nuestra población tiene una distribución respecto al estadio de Dukes³⁷⁸ de: 12 pacientes en el estadio A (3,5%), 171 en el estadio B (49,6%), 87 en estadio C (25,2%) y 75 en estadio D (21,7%) (gráfico 8).

A.4. Grado de diferenciación celular

Respecto al grado de diferenciación celular según la clasificación de Grinnell³⁷⁹ nuestra población se distribuye del modo siguiente: 226 tumores (65,5%) están bien diferenciados, 67 (19,4%) muestran una diferenciación moderada y 16 son indiferenciados (4,7%). Hay 36 tumores (10,4%) en los que no se pudo determinar su grado de diferenciación (gráfico 9)

A.5. Cirugía

Todos los pacientes fueron intervenidos: en 285 pacientes (82,6%) la cirugía fue curativa sin embargo fue paliativa en 60 pacientes (17,4%) (gráfico 10).

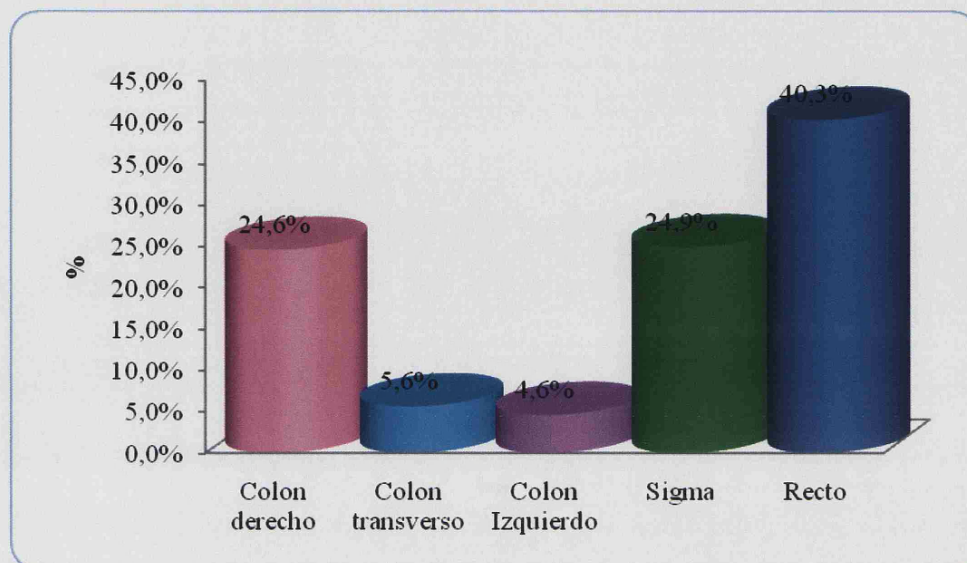


Gráfico 6. Distribución de tumores colorrectales según localización. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995- Noviembre 2009).

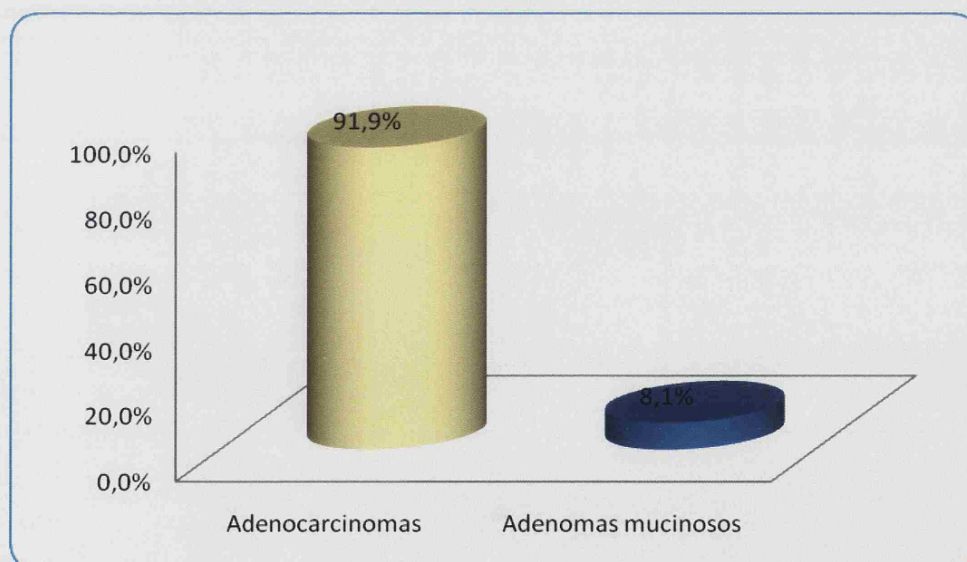


Gráfico 7. Distribución de tumores colorrectales según tipo histológico. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995- Noviembre 2009).

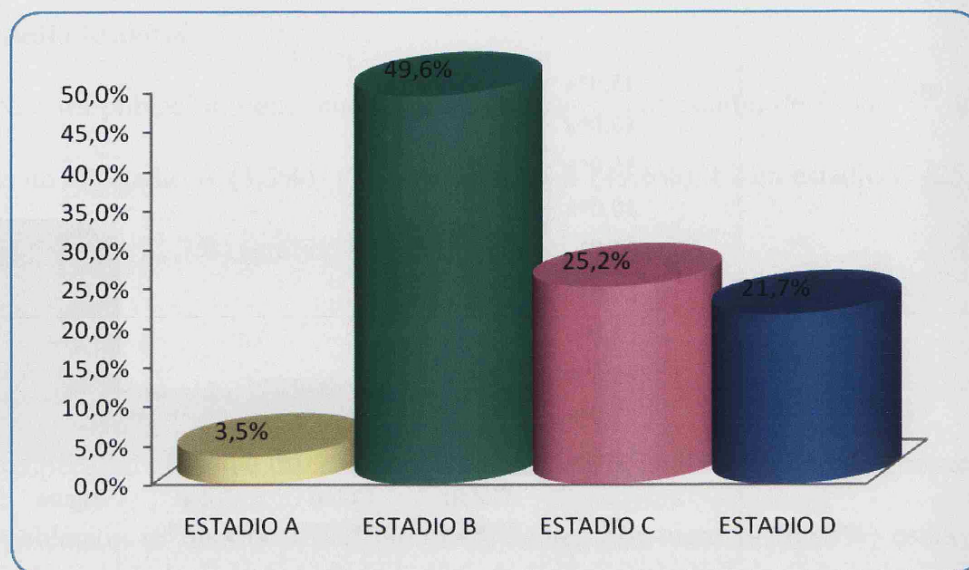


Gráfico 8. Distribución de tumores colorrectales según la clasificación de Dukes. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

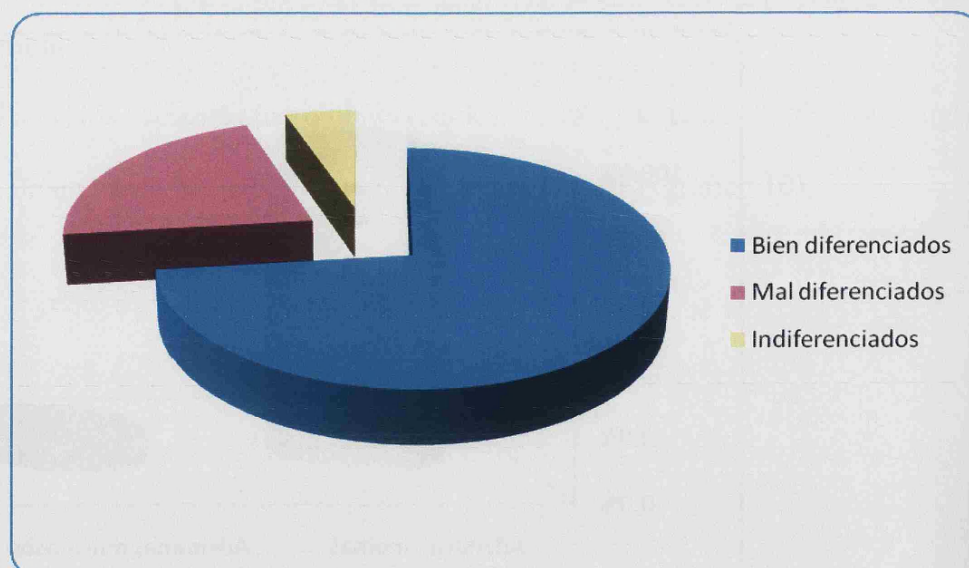


Gráfico 9. Distribución de tumores colorrectales según la clasificación de Grinnell de grado de diferenciación. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

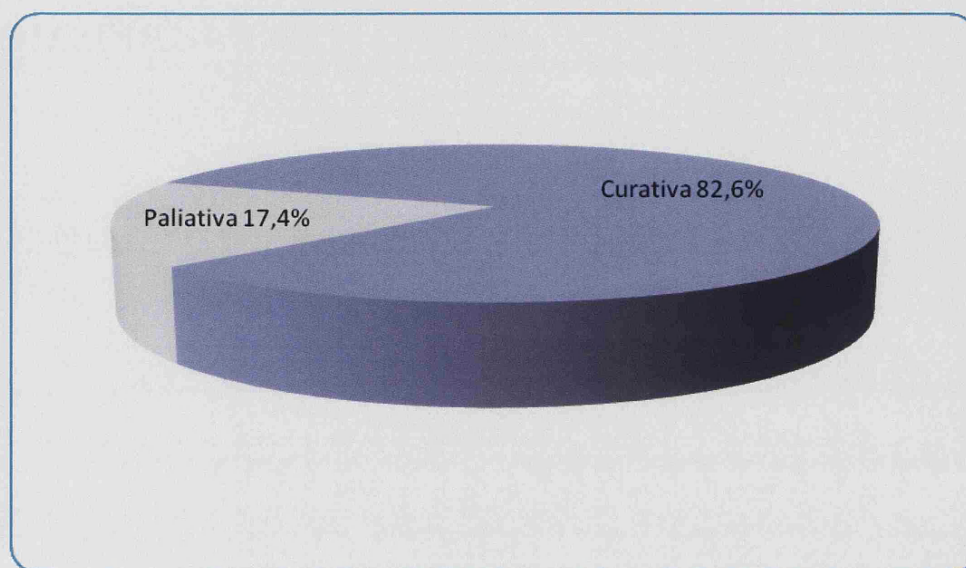


Gráfico 10. Distribución de tumores colorrectales según el tipo de cirugía. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995- Noviembre 2009).

II. ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN VEGF

El análisis de los polimorfismos se ha realizado en toda la población aunque en algunos pacientes no ha sido posible la determinación de los tres polimorfismos: el polimorfismo -2578 C>A no pudo determinarse en 3 pacientes (0,9%). En 4 pacientes de 345 (1,2%) no pudo identificarse el polimorfismo -1154 G>A y el polimorfismo +936 C>T no pudo analizarse en 3 pacientes (0,9%).

El polimorfismo -2578 C/A sigue la siguiente distribución en nuestra población de pacientes: 79 pacientes son homocigotos para el alelo A (22,9%), 168 son heterocigotos (48,7%) y 95 son homocigotos para el alelo C (27,5%) (Gráfico 11). La frecuencia del alelo C es de 0,52 y del A es de 0,48.

Las frecuencias en el polimorfismo -1154 G/A son: 76 pacientes son homocigotos AA (22,3%), 121 heterocigotos G/A son (35,5%) y 144 homocigotos G/G son (42,2%) (Gráfico 12). En este polimorfismo la frecuencia del alelo A es de 0,40 y del G es de 0,60.

La distribución del polimorfismo +936 C/T es: 5 pacientes (1,4 %) con genotipo T/T, 74 pacientes (21,4 %) de genotipo C/T y con genotipo C/C 263 individuos (76,2 %) (Gráfico 13). La frecuencia de los alelos para el polimorfismo +936 C/T es 0,88 para el alelo C y 0,12 para el alelo T.

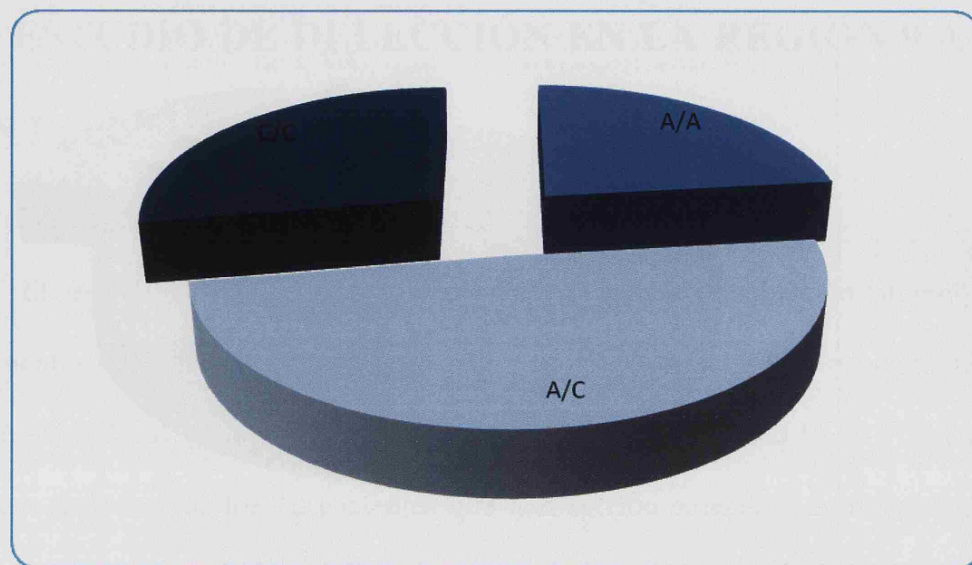


Gráfico 11. Distribución de tumores colorrectales según el genotipo del polimorfismo VEGF -2578 C/A. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009).

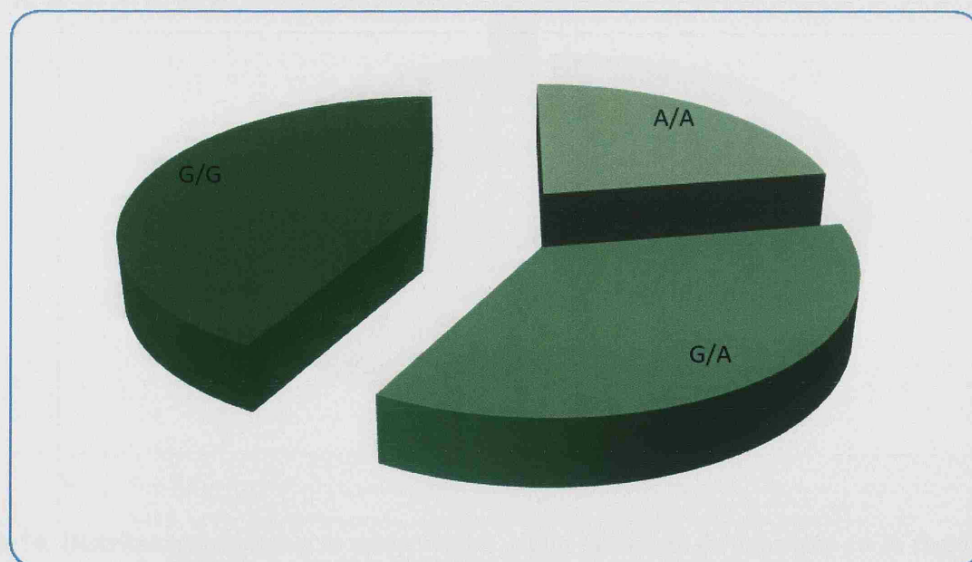


Gráfico 12. Distribución de tumores colorrectales según el genotipo del polimorfismo VEGF -1154 G/A. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009).

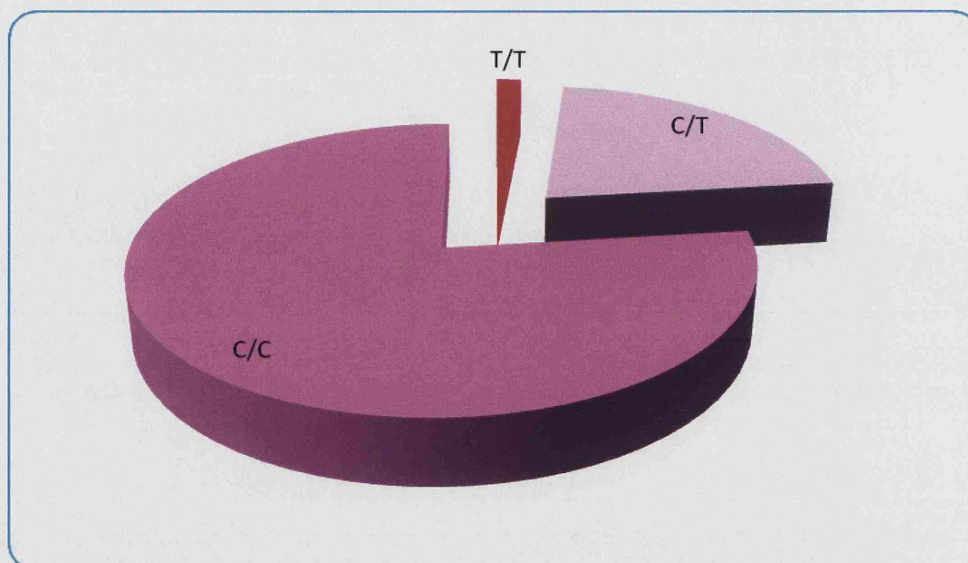


Gráfico 13. Distribución de tumores colorrectales según el genotipo del polimorfismo VEGF +936 C/T. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009).

III. ESTUDIO DE DELECCIÓN EN LA REGION 9 A DEL GEN EphB2

El análisis de la delección se ha realizado en toda la población sin embargo en 22 pacientes no pudo determinarse esta alteración. El 3,1% (10/323) presenta delección y el 96,9% (313/323) no tienen delección en la región 9A del gen EphB2 (Gráfico 14). Hay que destacar que los 10 pacientes que han sufrido delección en dicha región son heterocigotos T9/8.

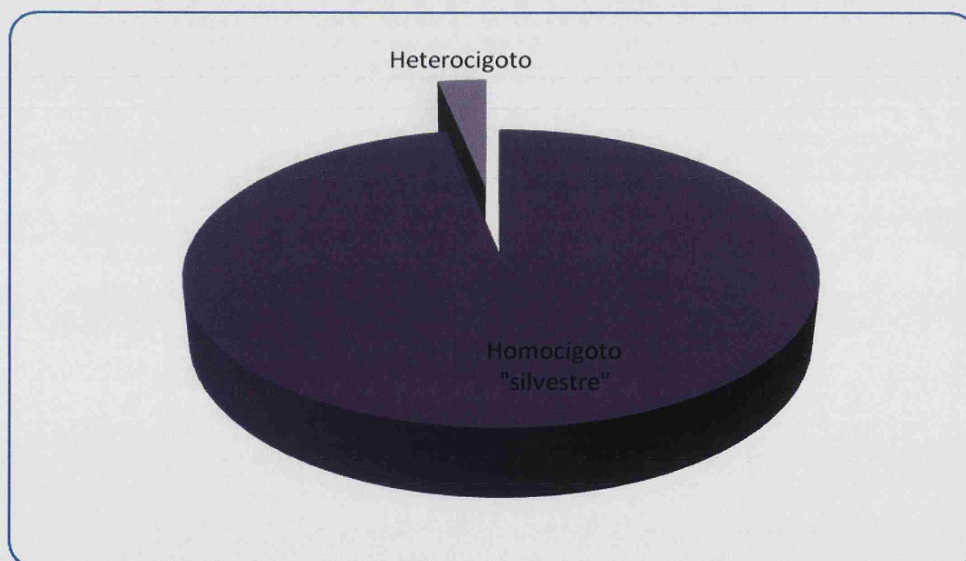


Gráfico 14. Distribución de tumores colorrectales según presencia de delección en la región 9A del gen EphB2. Serie de 323 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)

IV. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN VEGF -2578 C/A, -1154 G/A Y + 936 C/T CON LOS FACTORES PRONÓSTICO CLÁSICOS

IV.A Estudio de la relación del polimorfismo -2578 C/A del gen VEGF con los factores pronóstico clásicos

Al estudiar la relación del polimorfismo VEGF -2578 C/A con las variables clínico-patológicas del tumor no observamos relación estadísticamente significativa entre el sexo y este polimorfismo. Ambos sexos presentan frecuencias muy similares. De los 183 hombres estudiados el 21,3% son homocigotos mutados (A/A), el 50,8% heterocigotos (C/A) y el 27,9% presentan el alelo “silvestre” en homocigosis (C/C). De las 153 mujeres el 25,2% son A/A, el 47,2% son C/A y el 27,7% C/C ($p=0,67$). (Tabla 16)

Tampoco existe una asociación estadísticamente significativa entre este polimorfismo y la edad ($p=0,08$). Los pacientes con más de 70 años son 179, de los cuales 27,9% son homocigotos mutados, 45,8% heterocigotos y 26,3% son homocigotos “silvestres”. Los pacientes con edad menor o igual a 70 años son 163, de ellos el 17,8% tienen genotipo A/A, el 52,8% tienen genotipo C/A y el 29,4% tienen genotipo C/C.

El análisis del polimorfismo y la localización tumoral nos muestra que no hay relación entre ellos estadísticamente significativa ($p=0,41$). Los tumores localizados en

el colon son 204, de los cuales el 22,5% son homocigotos A/A, el 47,1% son heterocigotos A/C y el 30,4% son homocigotos C/C. De los 138 pacientes que presentan tumores localizados en recto, el 23,9% son A/A, el 52,2% son C/A y el 23,9% C/C.

Cuando analizamos los polimorfismos en las diferentes regiones del colon encontramos que en el colon derecho el 22,6% son homocigotos mutados, el 48,8% son heterocigotos y el 28,6% presentan el alelo "silvestre" en homocigosis. En el colon transversal el 26,3% son homocigotos A/A, el 57,9% heterocigotos C/A y homocigotos C/C el 15,8%. En el colon izquierdo: el 37,5% son homocigotos mutados, el 43,8% son heterocigotos y el 18,8% homocigotos "silvestre". En sigma el 18,8% son genotipo A/A, 43,5% genotipo C/A y 37,6% genotipo C/C ($p=0,37$).

Respecto al tipo histológico tampoco observamos una asociación estadísticamente significativa con el polimorfismo 2578C/A ($p=0,29$): el 24,1% de los adenocarcinomas son homocigotos -2578 A/A, el 48,3% son heterocigotos -2578 C/A y 27,6% son homocigotos -2578 C/C. La distribución de los tumores mucoides es: 11,1% homocigotos -2578 A/A; 59,3% heterocigotos -2578 C/A y 29,6% homocigotos -2578 C/C.

La distribución del polimorfismo VEGF -2578C/A según la clasificación de estadio tumoral de Dukes³⁷⁸ es: en el estadio A y B el 24,9% son tumores homocigotos -2578 A/A, el 50,3% heterocigotos -2578 C/A, el 24,9% homocigotos C/C. En el estadio C hay 19,8% tumores homocigotos -2578 A/A; 51,2% heterocigotos -2578 C/A; 29,1% homocigotos C/C. En el estadio D el 22,7% son tumores homocigotos -2578 A/A; el 44,0% heterocigotos -2578 C/A, el 33,3% homocigotos -2578 C/C. Al igual que en las asociaciones anteriores tampoco hay una relación estadísticamente significativa ($p=0,62$).

Respecto a la clasificación de Grinnell ³⁷⁹ del grado de diferenciación del tumor tenemos la siguiente distribución teniendo en cuenta el polimorfismo VEGF -2578 C/A: en el grupo de tumores bien diferenciados observamos un 24,0% de homocigotos -2578 A/A, un 47,1% de heterocigotos -2578 C/A, un 28,9% homocigotos -2578 C/C. En el grupo de tumores moderadamente diferenciados tenemos un 21,2 % de homocigotos -2578 A/A, un 54,5% heterocigotos -2578 C/A, un 24,2% homocigotos -2578 C/C. En los tumores indiferenciados tenemos un 31,3 % de homocigotos -2578 A/A, un 43,8% de heterocigotos -2578 C/A, un 25,0% de homocigotos -2578 C/C. No hay correlación estadísticamente significativa (p=0,80).

Variable	n (%)	VEGF- 2578 C/A			p
		A/A	A/C	C/C	
Sexo	Hombres: 183 (53,5%)	39 (21,3%)	93 (50,8%)	51 (27,9%)	0,67
	Mujeres: 159 (46,5%)	40 (25,2%)	75 (47,2%)	44 (27,7%)	
Edad	>70 años: 179 (52,3%)	50 (27,9%)	82 (45,8%)	47 (26,3%)	0,08
	≤70 años: 163 (47,7%)	29 (17,8%)	86 (52,8%)	48 (29,4%)	
Dukes	A+B: 181 (52,9%)	45 (24,9%)	91 (50,3%)	45 (24,9%)	0,62
	C: 86 (25,2%)	17 (19,8%)	44 (51,2%)	25 (29,1%)	
	D: 75 (21,9%)	17 (22,7%)	33 (44,0%)	25 (33,3%)	
Localización	Colon derecho: 84 (24,6%)	19 (22,6%)	41 (48,8%)	24 (28,6%)	0,37
	Colon transverso: 19 (5,6%)	5 (26,3%)	11 (57,9%)	3 (15,8%)	
	Colon izquierdo: 16 (4,7%)	6 (37,5%)	7 (43,8%)	3 (18,8%)	
	Sigma: 85 (24,8%)	16 (18,8%)	37 (43,5%)	32 (37,6%)	
	Recto: 138 (40,3%)	33 (23,9%)	72 (52,2%)	33 (23,9%)	
Tipo histológico	Adenocarcinoma: 315 (92,1%)	76 (24,1%)	152 (48,3%)	87 (27,6%)	0,29
	Mucoide: 27 (7,9%)	3 (11,1%)	16 (59,3%)	8 (29,6%)	
Grado de diferenciación*	I: 225 (73,3%)	54 (24,0%)	106 (47,1%)	65 (28,9%)	0,80
	II: 66 (21,5%)	14 (21,2%)	36 (54,5%)	16 (24,2%)	
	III: 16 (5,2%)	5 (31,3%)	7 (43,8%)	4 (25,0%)	

Tabla 16. Prevalencia del polimorfismo VEGF -2578 C/A en relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009). * Sólo se ha podido estudiar en 307 pacientes.

A.1. Estudio de la relación del alelo C del polimorfismo -2578 C/A del gen VEGF con los factores pronóstico clásicos

El estudio del análisis de la relación del alelo C del polimorfismo -2578 C/A y el sexo no nos mostró una asociación significativa ($p=0,44$). El 78,7% de los hombres y el 74,8% de las mujeres tienen el alelo C. (Tabla 17)

Encontramos una asociación significativa entre la edad y el alelo C del polimorfismo -2578C/A ($p=0,02$). El 82,2% de los pacientes de 70 años o menores son portadores del alelo C sin embargo sólo el 72,1% de los mayores de 70 años tienen este alelo (gráfico 15).

En el estudio de la relación del alelo C del polimorfismo -2578C/A con la localización del tumor no observamos una correlación significativa ($p=0,57$). La frecuencia de tumores con el alelo C localizados en el colon es de 77,5% y la de los tumores localizados en el recto es de 76,1%. Dentro de los tumores con alelo C localizados en el colon podemos observar que el 77,4% se localizan en el colon derecho, el 73,7% en el colon transversal, el 62,5% en el colon izquierdo y el 81,2% en sigma.

De acuerdo con la clasificación histológica, el 75,9% de los adenocarcinomas son portadores del alelo C y el 24,1% no lo son. El 88,9% de los carcinomas mucinosos son portadores del alelo C y sólo el 11,1% no son portadores ($p=0,15$).

El estudio de la relación del alelo C del polimorfismo -2578C/A y el estadio tumoral no mostró una relación estadísticamente significativa ($p=0,65$). La presencia del alelo C está distribuida: el 75,1% en los estadios precoces (A+B), el 80,2% en tumores en estadio C y el 77,3% en estadio D.

Al estudiar el grado de diferenciación tumoral y el alelo C de este polimorfismo observamos que no hay una relación significativa ($p=0,69$). De los tumores bien diferenciados el 76,0% portaban el alelo C, dentro de los tumores moderadamente diferenciados el 78,8% y de los mal diferenciados el 68,8%.

Variable	n (%)	VEGF- 2578 C/A		p
		C	no C	
Sexo	Hombres: 183 (53,5%) Mujeres: 159 (46,5%)	144 (78,7%) 119 (74,8%)	39 (21,3%) 40 (25,2%)	0,44
Edad	>70 años: 179 (52,3%) ≤70 años: 163 (47,7%)	129 (72,1%) 134 (82,2%)	50 (27,9%) 29 (17,8%)	0,02
Dukes	A+B: 181 (52,9%) C: 86 (25,2%) D: 75 (21,9%)	136 (75,1%) 69 (80,2%) 58 (77,3%)	45 (24,9%) 17 (19,8%) 17 (22,7%)	0,65
Localización	Colon derecho: 84 (24,5%) Colon transverso: 19 (5,5%) Colon izquierdo: 16 (4,7%) Sigma: 85 (24,9%) Recto: 138 (40,4%)	65 (77,4%) 14 (73,7%) 10 (62,5%) 69 (81,2%) 105 (76,1%)	19 (22,6%) 5 (26,3%) 6 (37,5%) 16 (18,8%) 33 (23,9%)	0,57
Tipo histológico	Adenocarcinoma: 315 (92,1%) Mucoide: 27 (7,9%)	239 (75,9%) 24 (88,9%)	76 (24,1%) 3 (11,1%)	0,15
Grado de diferenciación*	I: 225 (73,3%) II: 66 (21,5%) III: 16 (5,2%)	171 (76,0%) 52 (78,8%) 11 (68,8%)	54 (24,0%) 14 (21,2%) 5 (31,3%)	0,69

Tabla 17. Prevalencia del alelo C del polimorfismo VEGF -2578 C/A en relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de 342 pacientes diagnosticados de

carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009). *

Sólo se ha podido estudiar en 307 pacientes.

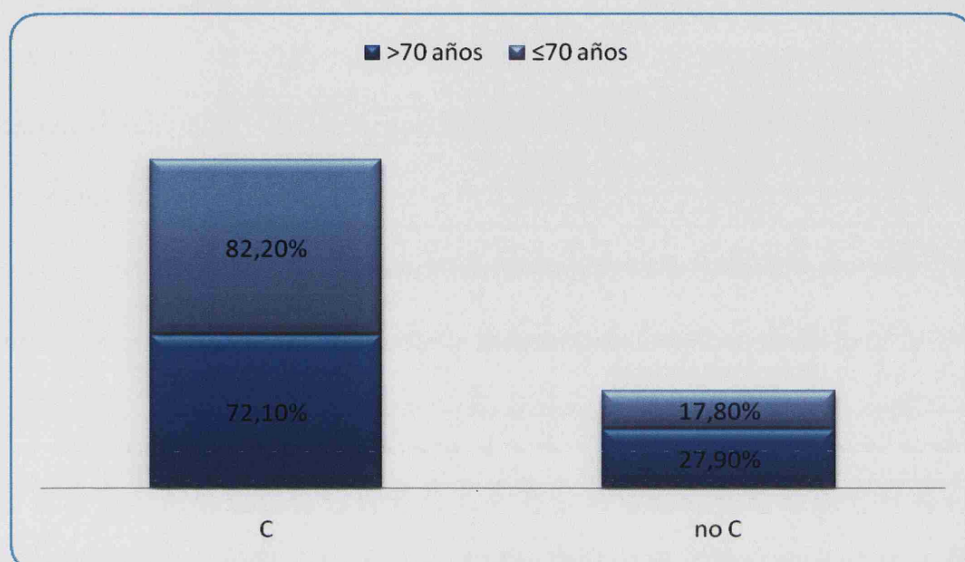


Gráfico 15. Distribución del alelo C del polimorfismo VEGF -2578 C/A según la edad de la población. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009).

A.2. Estudio de la relación del alelo A del polimorfismo -2578 C/A del gen VEGF con los factores pronóstico clásicos

Al estudiar la relación del alelo A del polimorfismo -2578C/A y el sexo no observamos una asociación significativa ($p=1,00$). El 72,1% de los hombres y el 72,3% de las mujeres tienen el alelo A.

Tampoco encontramos relación significativa cuando analizamos la edad y este alelo ($p=0,54$). El 73,7% de los pacientes mayores de 70 años y el 70,6% de los enfermos de 70 años o menores son portadores del alelo A. (Tabla 18)

En el estudio de la relación del alelo A del polimorfismo -2578C/A con la localización del tumor no observamos una correlación significativa ($p=0,12$). El alelo A

lo tienen el 69,6% de los tumores localizados en el colon y el 76,1% de tumores localizados en el recto. Los tumores localizados en el colon los podemos agrupar en tumores situados en colon derecho, colon transverso, colon izquierdo o sigma. La distribución del alelo A en ellos es la siguiente: el 71,4% de los tumores localizados en el colon derecho, el 84,2% de los localizados en el colon transverso, el 81,3% de los del colon izquierdo y el 62,4% de los tumores situados en sigma.

Tampoco encontramos una asociación entre el alelo A del polimorfismo VEGF - 2578 C/A y la clasificación histológica ($p=0,82$). El 72,4% de los adenocarcinomas y el 70,4% los carcinomas mucinosos tienen el alelo A.

El estudio de la relación del alelo A del polimorfismo -2578 C/A y el estadio tumoral no mostró una correlación significativa ($p=0,37$). De todos los tumores en estadio A y B son portadores del alelo A el 75,1%; el 70,9% de los tumores en estadio C son portadores del alelo A y el 66,7% de los tumores en estadio D.

Al estudiar el grado de diferenciación tumoral y el alelo A de este polimorfismo no encontramos una relación significativa ($p=0,74$). El 71,1% de los tumores bien diferenciados tienen el alelo A, de los tumores moderadamente diferenciados el 75,8% y de los indiferenciados el 75,0%.

Variable	n (%)	VEGF- 2578 C/A		p
		A	no A	
Sexo	Hombres: 183 (53,5%)	132 (72,1%)	51 (27,9%)	1,00
	Mujeres: 159 (46,5%)	115 (72,3%)	44 (27,7%)	
Edad	>70 años: 179 (52,3%)	132 (73,7%)	47 (26,3%)	0,54
	≤70 años: 163 (47,7%)	115 (70,6%)	48 (29,4%)	
Dukes	A+B: 181 (52,9%)	136 (75,1%)	45 (24,9%)	0,37
	C: 86 (25,2%)	61 (70,9%)	25 (29,1%)	
	D: 75 (21,9%)	50 (66,7%)	25 (33,3%)	
Localización	Colon derecho: 84 (24,5%)	60 (71,4%)	24 (28,6%)	0,12
	Colon transverso: 19 (5,5%)	16 (84,2%)	3 (15,8%)	
	Colon izquierdo: 16 (4,7%)	13 (81,3%)	3 (18,8%)	
	Sigma: 85 (24,9%)	53 (62,4%)	32 (37,6%)	
	Recto: 138 (40,4%)	105 (76,1%)	33 (23,9%)	
Tipo histológico	Adenocarcinoma: 315 (92,1%)	228 (72,4%)	87 (27,6%)	0,82
	Mucoide: 27 (7,9%)	19 (70,4%)	8 (29,6%)	
Grado de diferenciación*	I: 225 (73,3%)	160 (71,1%)	65 (28,9%)	0,74
	II: 66 (21,5%)	50 (75,8%)	16 (24,2%)	
	III: 16 (5,2%)	12 (75,0%)	4 (25,0%)	

Tabla 18. Prevalencia del alelo A del polimorfismo VEGF -2578 C/A en relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009). *
Sólo se ha determinado en 307 pacientes.

IV.B Estudio de la relación del polimorfismo del gen VEGF -1154 G/A con los factores pronóstico clásicos

El estudio de la relación del polimorfismo VEGF -1154 G/A con las variables clínico-patológicas del tumor nos demuestra que no hay una relación estadísticamente significativa entre sexo y este polimorfismo ($p=0,14$). La distribución de los hombres es: el 24,7% homocigotos mutados, el 30,8% heterocigotos y el 44,5% homocigotos

“silvestre”. La distribución de las mujeres: el 19,5% son homocigotas mutados AA, el 40,9% son heterocigotas G/A y el 39,6% son homocigotas G/G (tabla 19)

Tampoco existe una relación estadísticamente significativa entre el polimorfismo -1154 G/A y la edad ($p=0,14$). La distribución de los pacientes con más de 70 años: un 22,5% son genotipo A/A, 39,9% genotipo G/A y 37,6% genotipo G/G. Los pacientes de 70 años o de menor edad tienen la siguiente distribución: el 22,1% tienen genotipo A/A, el 30,7% tienen genotipo G/A y el 47,2% tienen genotipo G/G.

Como en los casos anteriores, el análisis del polimorfismo -1154 G/A y la localización tumoral nos demuestra que no tienen relación estadísticamente significativa ($p= 0,36$). De los tumores localizados en el colon un 20,7% son homocigotos mutados (A/A), un 34,0% son heterocigotos (G/A) y un 45,3% son homocigotos “silvestres” (G/G). En el recto el 24,6% son homocigotos A/A, heterocigotos G/A son 37,7% y 37,7% homocigotos G/G.

Al agrupar los tumores en función de su localización en el colon tampoco observamos una asociación ($p=0,48$). En el colon derecho el 23,8% son homocigotos mutadas, el 34,5% son heterocigotas y el 41,7% homocigotos “silvestres”. En el colon transversal tienen genotipo A/A un 21,1%, genotipo G/A un 42,1% y genotipo G/G un 36,8%. En el colon izquierdo un 31,3% son homocigotos mutados, un 37,5% son heterocigotos y un 31,3% homocigotos “silvestres”. En sigma: el 15,5% son homocigotos mutados, el 31,0% son heterocigotos y el 53,6% son homocigotos “silvestre”.

El tipo histológico y el polimorfismo -1154 G/A tampoco muestran una asociación estadísticamente significativa ($p=0,61$). De los adenocarcinomas el 22,9% son homocigotos mutados, el 35,4% son heterocigotos y el 41,7% son homocigotos

“silvestre”. De los tumores mucoides son homocigotos A/A el 14,8%, son heterocigotos G/A el 37,0% y son homocigotos G/G son 48,1%.

No hay una relación estadísticamente significativa entre del polimorfismo VEGF -1154 G/A y la clasificación de estadio tumoral de Dukes ³⁷⁸ ($p=0,86$). La distribución del estadio tumoral es: en el estadio A+ B el 22,8% tienen genotipo -1154 A/A, el 37,2% genotipo -1154 G/A, el 40,0% genotipo G/G. En el estadio C: el 20,9% son tumores homocigotos mutados, el 36,0% heterocigotos, el 43,0% homocigotos “silvestre”. En el estadio D el 22,7% son homocigotos mutados, el 30,7% heterocigotos, el 46,7% homocigotos “silvestre”.

Respecto a la clasificación de Grinnell ³⁷⁹ del grado de diferenciación tumoral tenemos la siguiente distribución respecto el polimorfismo VEGF -1154G/A: dentro de los tumores bien diferenciados el 21,0% tiene genotipo A/A, el 33,5% tiene genotipo G/A y el 45,5% tiene genotipo G/G. En cuanto a los moderadamente diferenciados el 22,7 % son homocigotos mutados, el 39,4% son heterocigotos y el 37,9% son homocigotos “silvestre”. Dentro de los tumores indiferenciados son homocigotos A/A el 37,5%, heterocigotos G/A el 31,3% y homocigotos G/G el 31,3%. Al igual que en los casos anteriores no hay relación estadísticamente significativa ($p=0,45$).

		VEGF- 1154G/A			p
Variable	n (%)	A/A	G/A	G/G	
Sexo	Hombres: 182 (53,24%)	45 (24,7%)	56 (30,8%)	81 (44,5%)	0,14
	Mujeres: 159 (46,6%)	31 (19,5%)	65 (40,9%)	63 (36,9%)	
Edad	>70 años: 178 (52,2%)	40 (22,5%)	71 (39,9%)	67 (37,6%)	0,14
	≤70 años: 163 (47,8%)	36 (22,1%)	50 (30,7%)	77 (47,2%)	
Dukes	A+B: 180 (52,8%)	41 (22,8%)	67 (37,2%)	72 (40,0%)	0,86
	C: 86 (25,2%)	18 (20,9%)	31 (36,0%)	37 (43,0%)	
	D: 75 (22,0%)	17 (22,7%)	23 (30,7%)	35 (46,7%)	
Localización	Colon proximal: 84 (24,6%)	20 (23,8%)	29 (34,5%)	35 (41,7%)	0,48
	Colon transverso: 19 (5,6%)	4 (21,1%)	8 (42,1%)	7 (36,8%)	
	Colon izquierdo: 16 (4,7%)	5 (31,3%)	6 (37,5%)	5 (31,3%)	
	Sigma: 84 (24,6%)	13 (15,5%)	26 (31,0%)	45 (53,6%)	
	Recto: 138 (40,5%)	34 (24,6%)	52 (37,7%)	52 (37,7%)	
Tipo histológico	Adenocarcinoma: 314 (92,1%)	72 (22,9%)	111 (35,4%)	131 (41,7%)	0,61
	Mucoide: 27 (7,9%)	4 (14,8%)	10 (37,0%)	13 (48,1%)	
Grado de diferenciación*	I: 224 (73,2%)	47 (21,0%)	75 (33,5%)	102 (45,5%)	0,45
	II: 66 (21,6%)	15 (22,7%)	26 (39,4%)	25 (37,9%)	
	III: 16 (5,2%)	6 (37,5%)	5 (31,3%)	5 (31,3%)	

Tabla 19. Prevalencia del polimorfismo VEGF -1154 G/A en relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009). * Sólo se determinó en 306 pacientes.

B.1. Estudio de la relación del alelo G del polimorfismo -1154 G/A del gen VEGF con los factores pronóstico clásicos

El análisis de la relación del alelo G del polimorfismo -1154 G/A y el sexo no nos mostró una asociación significativa ($p= 0,30$). El 75,3% de los hombres y el 80,5 % de las mujeres son portadoras del alelo G (tabla 20).

El estudio de este alelo del polimorfismo -1154 G/A y la edad tampoco nos demuestra una relación significativa ($p=1,00$). El 77,5% de los mayores de 70 años y el 77,9% de los pacientes de 70 años o de menor edad son portadores del alelo G.

Cuando analizamos la relación del alelo G del polimorfismo -1154G/A con la localización del tumor no observamos una relación significativa ($p=0,43$). La frecuencia de tumores con el alelo G localizados en el colon es de 79,3% y la de los tumores localizados en el recto es de 75,4%. La distribución de los tumores localizados en el colon con alelo G es la siguiente: 76,2% en el colon derecho, el 78,9% en el colon transversal, el 68,8% en el colon izquierdo, el 84,5% en sigma.

La distribución del alelo G de este polimorfismo de acuerdo con la clasificación histológica es: el 77,1% de los adenocarcinomas y el 85,2% de los carcinomas mucinosos. No hay una correlación significativa entre estas dos variables ($p=0,47$).

El análisis de la asociación del alelo G del polimorfismo -1154 G/A y el estadio tumoral según la clasificación de Dukes no mostró una correlación significativa ($p=0,94$). De todos los tumores en estadio A +B son portadores del alelo G el 77,2%; en estadio C el 79,1% y el 77,3% de los tumores en estadio D.

Al estudiar el grado de diferenciación tumoral y el alelo G de este polimorfismo observamos que no hay una relación significativa ($p=0,31$). El 79,0% de los tumores bien diferenciados portaban el alelo G, de los tumores moderadamente diferenciados el 77,3% y el 62,5% de los indiferenciados.

Variable	n (%)	VEGF- 1154 G/A		p
		G	no G	
Sexo	Hombres: 182 (53,4%)	137 (75,3%)	45 (24,7%)	0,30
	Mujeres: 159 (46,6%)	128 (80,5%)	31 (19,5%)	
Edad	>70 años: 178 (52,2%)	138 (77,5%)	40 (22,5%)	1,00
	≤70 años: 163 (47,8%)	127 (77,9%)	36 (22,1%)	
Dukes	A+B: 180 (52,8%)	139 (77,2%)	41 (22,8%)	0,94
	C: 86 (25,2%)	68 (79,1%)	18 (20,9%)	
	D: 75 (22,0%)	58 (77,3%)	17 (22,7%)	
Localización	Colon derecho: 84 (24,6%)	64 (76,2%)	20 (23,8%)	0,43
	Colon transverso: 19 (5,6%)	15 (78,9%)	4 (21,1%)	
	Colon izquierdo: 16 (4,7%)	11 (68,8%)	5 (31,3%)	
	Sigma: 84 (24,6%)	71 (84,5%)	13 (15,5%)	
	Recto: 138(40,5%)	104 (75,4%)	34 (24,6%)	
Tipo histológico	Adenocarcinoma: 314 (92,1%)	242 (77,1%)	72 (22,9%)	0,47
	Mucoide: 27 (7,9%)	23 (85,2%)	4 (14,8%)	
Grado de diferenciación*	I: 224 (73,2%)	177 (79,0%)	47 (21,0%)	0,31
	II: 66 (21,6%)	51 (77,3%)	15 (22,7%)	
	III: 16 (5,2%)	10 (62,5%)	6 (37,5%)	

Tabla 20. Prevalencia del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A en relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009). *
Sólo se determinó en 306 pacientes.

B.2. Estudio de la relación del alelo A del polimorfismo -1154 G/A del gen VEGF con los factores pronóstico clásicos

El análisis de la relación del alelo A del polimorfismo -1154 G/A y el sexo no muestra una asociación significativa ($p=0,44$). El 56,0% de los hombres y el 60,4% de las mujeres tienen el alelo A. Lo mismo sucede cuando analizamos la asociación entre la edad y este alelo ($p=0,06$). El 62,9% de los pacientes mayores de 70 años y el 52,8% de los enfermos de 70 años o de menor edad son portadores del alelo A (tabla 21).

El análisis de la asociación entre el alelo A del polimorfismo -1154G/A y la localización tumoral no muestra una relación significativa ($p=0,15$). El 55,2% de los tumores localizados en el colon y el 62,3% de tumores localizados en el recto tienen el alelo A. Los tumores localizados en el colon los podemos agrupar en tumores situados en colon derecho, colon transverso, colon izquierdo o sigma. La distribución del alelo A en ellos es la siguiente: el 59,5%; el 63,2%; el 68,8% y el 46,4% respectivamente.

Respecto a la clasificación histológica de Grinnell y el alelo A del polimorfismo VEGF -1154G/A tampoco encontramos una relación significativa ($p=0,55$). El alelo A lo tienen en el 58,6% de los adenocarcinomas y en el 51,9% de los tumores mucoides.

Al analizar la asociación entre el estadio tumoral de Dukes y el alelo A del polimorfismo -1154 G/A no observamos una correlación significativa ($p=0,62$). El 60,0% de los tumores en estadio A+B tienen el alelo A, el 58,1% de los tumores en estadio C y el 53,3% de los tumores en estadio D.

Tampoco observamos una asociación significativa entre el grado de diferenciación tumoral y el alelo A de este polimorfismo ($p=0,26$). De los tumores bien diferenciados el 54,5% tienen el alelo A, de los tumores moderadamente diferenciados el 63,6% y de los indiferenciados el 68,8%.

		VEGF- 1154 G/A		
Variable	n (%)	A	no A	p
Sexo	Hombres: 182 (53,4%)	102 (56,0%)	80 (44,0%)	0,44
	Mujeres: 159 (46,6%)	96 (60,4%)	63 (39,6%)	
Edad	>70 años: 178 (52,2%)	112 (62,9%)	66 (37,1%)	0,06
	≤70 años: 163 (47,8%)	86 (52,8%)	77 (47,2%)	
Dukes	A+B: 180 (52,8%)	108 (60,0%)	72 (40,0%)	0,62
	C: 86 (25,2%)	50 (58,1%)	36 (41,9%)	
	D: 75 (22,0%)	40 (53,3%)	35 (46,7%)	
Localización	Colon derecho: 84 (24,6%)	50 (59,5%)	34 (40,5%)	0,15
	Colon transverso: 19 (5,6%)	12 (63,2%)	7 (36,8%)	
	Colon izquierdo: 16 (4,7%)	11 (68,8%)	5 (31,3%)	
	Sigma: 84 (24,76%)	39 (46,4%)	45 (53,6%)	
	Recto: 138 (40,5%)	86 (62,3%)	52 (37,7%)	
Tipo histológico	Adenocarcinoma: 314 (92,1%)	184 (58,6%)	130 (41,4%)	0,55
	Mucoide: 27 (7,9%)	14 (51,9%)	13 (48,1%)	
Grado de diferenciación*	I: 224 (73,2%)	122 (54,5%)	102 (45,5%)	0,26
	II: 66 (21,6%)	42 (63,6%)	24 (36,4%)	
	III: 16 (5,2%)	11 (68,8%)	5 (31,3%)	

Tabla 21. Prevalencia del alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A en relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009). *
Sólo se determinó en 306 pacientes.

IV.C. Estudio de la relación del polimorfismo del gen VEGF + 936 C/T con los factores pronóstico clásicos

Al analizar la relación del polimorfismo VEGF + 936 C/T con las variables clínico-patológicas del tumor observamos que hay una asociación estadísticamente significativa entre sexo y este polimorfismo ($p= 0,01$). (Gráfico 16). El 0,5% de los hombres son homocigotos TT, el 27,3% son heterocigotos CT y el 72,1% son homocigotos CC. La distribución de las mujeres es la siguiente: 2,5% son homocigotas

TT, 15,1% son heterocigotas CT y 82,4% son homocigotas CC. Es decir la mayoría en ambos sexos son homocigotos “silvestre” (tabla 22).

Sin embargo entre este polimorfismo y la edad no existe una relación estadísticamente significativa ($p=0,37$). De los pacientes con más de 70 años: el 2,2% son homocigotos mutados (TT), el 20,1% son heterocigotos (CT) y el 77,7% son homocigotos “silvestre” (CC). La distribución de los pacientes de 70 años o de menor edad es: 0,6% homocigotos mutados, 23,3% heterocigotos y el 76,1% homocigoto “silvestre”.

El estudio del polimorfismo +936 C/T y la localización tumoral nos demuestra que no hay una relación estadísticamente significativa entre ellos ($p= 0,62$). De los tumores localizados en el colon: el 1,0% tiene genotipo T/T, el 21,1% genotipo C/T y 77,9% genotipo C/C. En el recto el 2,2% tiene genotipo T/T, el 22,5% genotipo C/T y 75,4% genotipo C/C. Lo mismo sucede si diferenciamos los tumores en función de su localización en el colon ($p=0,47$). En el colon derecho 1,2% son homocigotos mutados, 21,4% son heterocigotos y 77,4% homocigotos “silvestres”. En el colon transversal el 100% es homocigoto “silvestre”. En el colon izquierdo 31,2% son heterocigotos y 68,8% homocigotos “silvestres”. En sigma: el 1,2% son homocigotos T/T, el 23,5% son heterocigotos C/T y el 75,3% son homocigotos C/C.

El estudio de la relación entre el tipo histológico y el polimorfismo +936 C/T tampoco muestra una asociación estadísticamente significativa ($p=0,49$). De los adenocarcinomas el 1,3% son TT, 21,3% son CT y el 77,5% son CC. De los tumores mucoides son homocigotos T/T el 3,7%, son heterocigotos C/T el 25,9% y son homocigotos C/C el 70,4%.

Entre del polimorfismo VEGF +936 C/T y la clasificación de estadio tumoral de Dukes ³⁷⁸ hay una relación estadísticamente significativa ($p= 0,03$). En el estadio A o B el 1,7% son homocigotos mutados, el 23,8% son heterocigotos y el 74,6 son homocigotos “silvestres”. En el estadio C el 2,3% tiene genotipo T/T, el 26,7% tiene genotipo C/T y el 70,9% tiene genotipo C/C. En el estadio D el 10,7% son heterocigotos y el 89,3% homocigotos “silvestre” (gráfico 17).

El estudio de este polimorfismo y la clasificación de Grinnell ³⁷⁹ del grado de diferenciación tumoral nos muestra que no hay una asociación significativa entre ellos ($p= 0,31$). Tenemos la siguiente distribución dentro de los tumores bien diferenciados el 2,2% es homocigoto T/T, el 22,7% es heterocigoto C/T y el 75,1% es homocigoto C/C. En cuanto a los moderadamente diferenciados el 13,6% son heterocigotos y el 86,4% son homocigotos “silvestre”. Dentro de los tumores indiferenciados son heterocigotos el 25,0% y el 75,0% son homocigotos “silvestre”.

Variable	n (%)	VEGF +936 C/T			p
		T/T	C/T	C/C	
Sexo	Hombres: 183 (53,5%)	1 (0,5%)	50 (27,3%)	132 (72,1%)	0,01
	Mujeres: 159 (46,5%)	4 (2,5%)	24 (15,1%)	131 (82,4%)	
Edad	>70 años: 179 (52,3%)	4 (2,2%)	36 (20,1%)	139 (77,7%)	0,37
	≤70 años: 163 (47,7%)	1 (0,6%)	38 (23,3%)	124 (76,1%)	
Dukes	A+B: 181 (53,0%)	3 (1,7%)	43 (23,8%)	135 (74,6%)	0,03
	C: 86 (25,0%)	2 (2,3%)	23 (26,7%)	61 (70,9%)	
	D: 75 (22,0%)	0 (0,0%)	8 (10,7%)	67 (89,3%)	
Localización	Colon proximal: 84 (24,6%)	1 (1,2%)	18 (21,4%)	65 (77,4%)	0,47
	Colon transverso: 19 (5,6%)	0 (0%)	0 (0,0%)	19 (100%)	
	Colon izquierdo: 16 (4,7%)	0 (0%)	5 (31,2%)	11 (68,8%)	
	Sigma: 85 (24,8%)	1 (1,2%)	20 (23,5%)	64 (75,3%)	
	Recto: 138 (40,3%)	3 (2,2%)	31 (22,5%)	104 (75,4%)	
Tipo histológico	Adenocarcinoma: 315 (92,1%)	4 (1,3%)	67 (21,3%)	244 (77,5%)	0,49
	Mucoide: 27 (7,9%)	1 (3,7%)	7 (25,9%)	19 (70,4%)	
Grado de diferenciación*	I: 5 (1,6%)	5 (2,2%)	51 (22,7%)	169 (75,1%)	0,31
	II: 64 (20,8%)	0 (0,0%)	9 (13,6%)	57 (86,4%)	
	III: 238 (77,5%)	0 (0,0%)	4 (25,0%)	12 (75,0%)	

Tabla 22. Prevalencia del polimorfismo VEGF +936 C/T en relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009). * Sólo se pudo determinar en 307 pacientes.

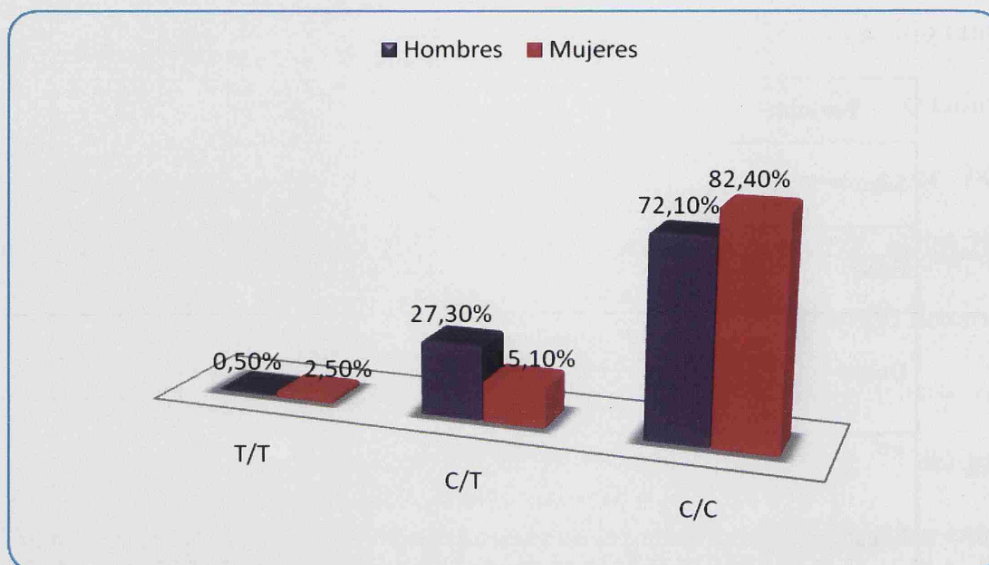


Gráfico 16. Distribución del polimorfismo VEGF +936 C/T en función del sexo. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)

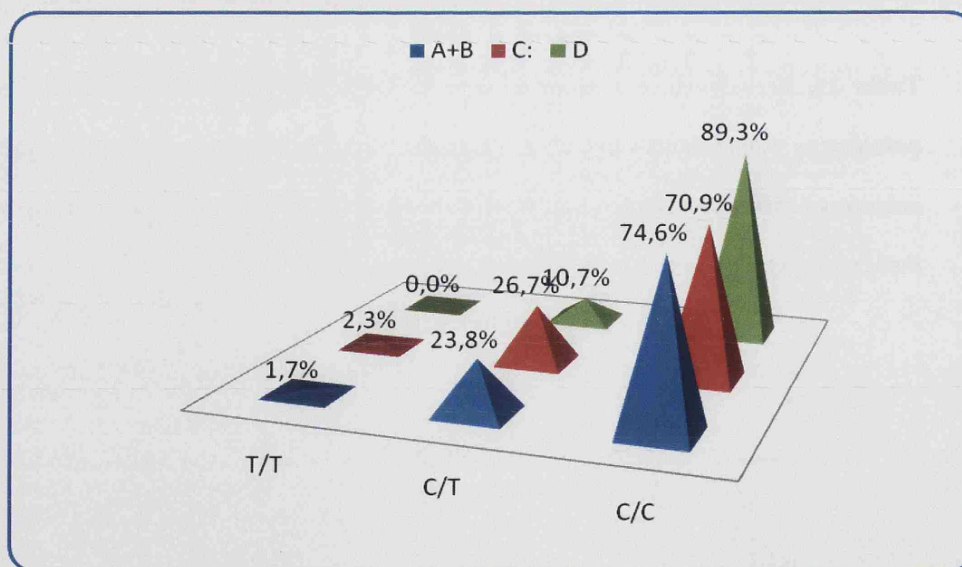


Gráfico 17. Distribución del polimorfismo VEGF +936 C/T según el estadio de Dukes. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)

C.1. Estudio de la relación del alelo C del polimorfismo +936 C/T del gen VEGF con los factores pronóstico clásicos

El estudio de la asociación entre el alelo C del polimorfismo +936C/T y el sexo no nos mostró una asociación significativa ($p=0,19$). El 99,5% de los hombres y el 97,5% de las mujeres tienen este alelo. Lo mismo sucede cuando analizamos el mismo alelo y la edad ($p=0,37$). El 97,8% de los mayores de 70 años y el 99,4% de los pacientes de 70 años o de menor edad son portadores del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T (Tabla 23)

Al estudiar la relación de la localización del tumoral con el alelo C del polimorfismo +936 C/T no observamos una correlación significativa ($p=0,90$). De los tumores localizados en el colon el 99,0% tiene este alelo y la frecuencia de este alelo en los tumores localizados en el recto es de 97,8%. La distribución de los tumores localizados en el colon con alelo C del polimorfismo +936 C/T es la siguiente: 98,8% de los tumores del colon derecho, el 100,0% en el colon transversal, el 100,0% en el colon izquierdo y el 98,8% de los tumores situados en sigma.

La frecuencia del alelo C de este polimorfismo de acuerdo con la clasificación histológica es: el 98,7% de los adenocarcinomas y el 96,3% de los carcinomas mucinosos. No hay una correlación significativa entre estas dos variables ($p=0,34$).

El estudio de la relación del alelo C de este polimorfismo y el estadio tumoral según la clasificación de Dukes no mostró una relación significativa ($p=0,45$). Observamos que la frecuencia del alelo C es del 98,3% en los tumores en estadio A+ B, del 97,7% en estadio C y del 100% en los tumores en estadio D.

El estudio de la asociación entre el grado de diferenciación tumoral y el alelo C de este polimorfismo muestra que no hay una relación significativa ($p=0,40$). El 100,0% de los tumores moderadamente diferenciados e indiferenciados tienen este alelo y su frecuencia en los tumores bien diferenciados es 97,8%.

Variable	n (%)	VEGF- 936C/T		p
		C	no C	
Sexo	Hombres: 183 (53,5%)	182 (99,5%)	1 (0,5%)	0,19
	Mujeres: 159 (46,5%)	155 (97,5%)	4 (2,5%)	
Edad	>70 años: 179 (52,3%)	175 (97,8%)	4 (2,2%)	0,37
	≤70 años: 163 (47,7%)	162 (99,4%)	1 (0,6%)	
Dukes	A+B: 181 (52,9%)	178 (98,3%)	3 (1,7%)	0,45
	C: 86 (25,1%)	84 (97,7%)	2 (2,3%)	
	D: 75 (22,0%)	75 (100%)	0 (0,0%)	
Localización	Colon derecho: 84 (24,6%)	83 (98,8%)	1 (1,2%)	0,90
	Colon transverso: 19 (5,5%)	19 (100%)	0 (0,0%)	
	Colon izquierdo: 16 (4,7%)	16 (100%)	0 (0,0%)	
	Sigma: 85 (24,9%)	84 (98,8%)	1 (1,2%)	
	Recto: 138 (40,3%)	135 (97,8%)	3 (2,2%)	
Tipo histológico	Adenocarcinoma: 315 (92,1%)	311 (98,7%)	4 (1,3%)	0,34
	Mucoide: 27 (7,9%)	26 (96,3%)	1 (3,7%)	
Grado de diferenciación*	I: 225 (73,3%)	220 (97,8%)	5 (2,2%)	0,40
	II: 66 (21,5%)	66 (100%)	0 (0,0%)	
	III: 16 (5,2%)	16 (100%)	0 (0,0%)	

Tabla 23. Prevalencia del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T en relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009). *
Sólo se determinó en 307 pacientes.

C.2. Estudio de la relación del alelo T del polimorfismo +936 C/T del gen VEGF con los factores pronóstico clásicos

El análisis de la relación del alelo T del polimorfismo +936C/T y el sexo muestra una asociación significativa ($p=0,03$) (Gráfico 18). La frecuencia del alelo en los hombres es del 27,9% y del 17,6% en las mujeres (tabla 24).

No se encontró una relación significativa entre el alelo T del polimorfismo +936 C/T y la edad ($p=0,80$). El 22,3% de los pacientes mayores de 70 años y el 23,9% de los enfermos de 70 años o menores son portadores del alelo T.

El estudio de la asociación entre la localización tumoral y el alelo T de este polimorfismo mostró que no existe una correlación significativa entre ellos ($p=0,16$). El 22,5% de los tumores localizados en el colon y el 24,6% de tumores localizados en el recto tienen este alelo. Los tumores localizados en el colon los podemos agrupar en tumores situados en colon derecho, colon transversal, colon izquierdo o sigma. La distribución de la frecuencia del alelo 936T en ellos es la siguiente: el 22,6%; el 0,0%; el 31,3% y el 24,7% respectivamente.

Respecto a la clasificación histológica y el alelo T del polimorfismo +936 C/T tampoco encontramos una relación significativa ($p=0,47$). La frecuencia de este alelo en los adenocarcinomas es del 22,5% y de los adenomas mucinosos es del 29,6%.

Por el contrario, el estudio de la relación entre el estadio tumoral de Dukes y el alelo T del polimorfismo +936 C/T muestra una relación significativa ($p=0,01$). Su frecuencia en los tumores en estadio A+ B es del 25,4%, del 29,1% de los tumores en estadio C y del 10,7% de los tumores en estadio D (gráfico 19).

No encontramos una asociación significativa entre el grado de diferenciación tumoral y el alelo T de este polimorfismo ($p=0,15$). La frecuencia del alelo en los tumores bien diferenciados es del 24,9%, del 13,6% en los tumores moderadamente diferenciados y del 25,0% en los indiferenciados.

Variable	n (%)	VEGF- 936 C/T		p
		T	no T	
Sexo	Hombres: 183 (52,3%)	51 (27,9%)	132 (72,1%)	0,03
	Mujeres: 163 (47,7%)	28 (17,6%)	131 (82,4%)	
Edad	>70 años: 179 (52,3%)	40 (22,3%)	139 (77,7%)	0,80
	≤70 años: 163 (47,4%)	39 (23,9%)	124 (76,1%)	
Dukes	A+B: 181 (52,9%)	46 (25,4%)	135 (74,6%)	0,01
	C: 86 (25,12%)	25 (29,1%)	61 (70,9%)	
	D: 75 (21,9%)	8 (10,7%)	67 (89,3%)	
Localización	Colon derecho: 84 (24,6%)	19 (22,6%)	65 (77,4%)	0,16
	Colon transverso: 19 (5,6%)	0 (0,0%)	19 (100%)	
	Colon izquierdo: 16 (4,7%)	5 (31,3%)	11 (68,8%)	
	Sigma: 85 (24,8%)	21 (24,7%)	64 (75,3%)	
	Recto: 138 (40,3%)	34 (24,6%)	104 (75,4%)	
Tipo histológico	Adenocarcinoma: 315 (92,1%)	71 (22,5%)	244 (77,5%)	0,47
	Mucoide: 27 (7,9%)	8 (29,6%)	19 (70,4%)	
Grado de diferenciación*	I: 225 (73,3%)	56 (24,9%)	169 (75,1%)	0,15
	II: 66 (21,5%)	9 (13,6%)	57 (86,4%)	
	III: 16 (5,2%)	4 (25,0%)	12 (75,0%)	

Tabla 24. Prevalencia del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T en relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009). *
Sólo se ha determinado en 307 pacientes

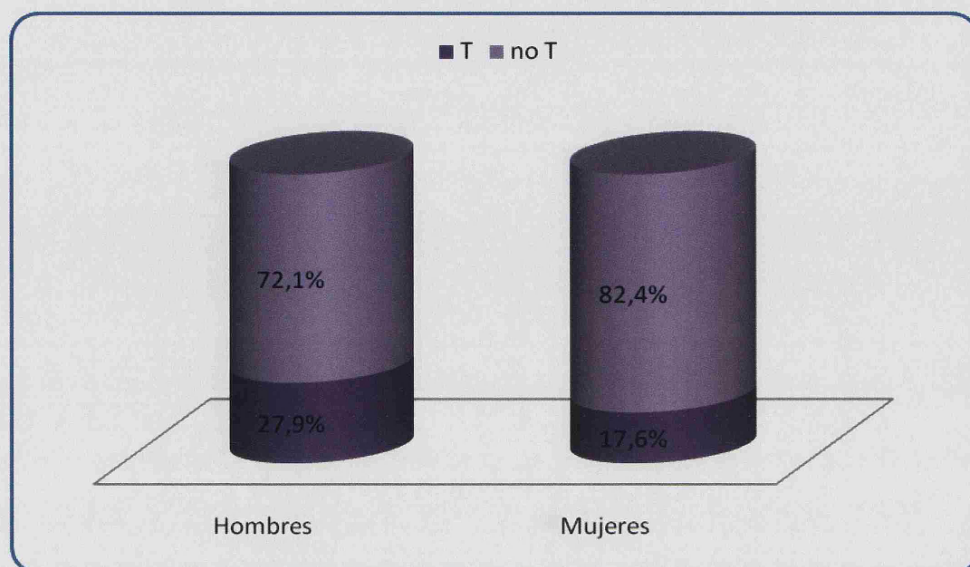


Gráfico 18. Distribución del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T en función del sexo. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)

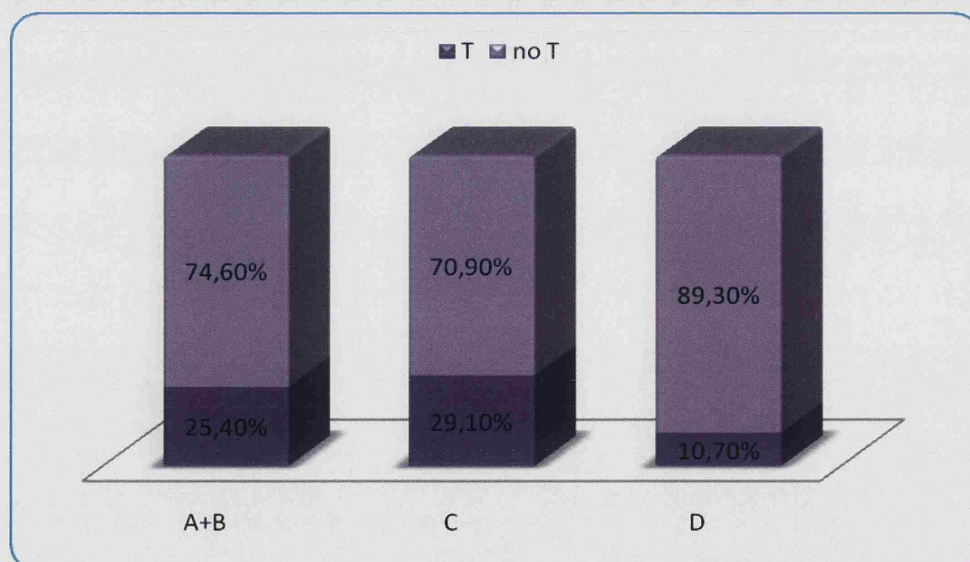


Gráfico 19. Distribución del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T según el estadio de Dukes. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)

V. ESTUDIO DEL HAPLOTIPO

En esta muestra no se ha encontrado que el haplotipo se asocie al pronóstico del CCR.

VI. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE DELECCIÓN EN LA REGION 9 A DEL GEN EphB2 CON LOS FACTORES PRONÓSTICO CLÁSICOS

El estudio de la relación de esta alteración génica con las variables clínico-patológicas del tumor nos muestra que no hay una asociación estadísticamente significativa entre la delección estudiada y el sexo. De los 172 hombres analizados el 2,9% presenta la delección y el 97,1% no. De las 154 mujeres el 3,3% son heterocigotas para la delección y el 96,7% son homocigotas “silvestre” ($p=1,00$) (tabla 25).

Tampoco observamos una asociación estadísticamente significativa entre la edad y la delección en la región 9A del gen EphB2 ($p=0,34$). Los pacientes mayores de 70 años son 169, de los cuales 4,1% han sufrido dicha delección y el 95,9% no. Los de 70 años de edad o menores son 154, el 1,9% de ellos tienen la alteración estudiada sin embargo el 98,1% no la tienen.

No hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa entre la clasificación de estadio tumoral de Dukes³⁷⁸ y la alteración génica estudiada ($p=0,51$). En el estadio A y B se encuentran 173 tumores, de ellos el 97,7% no tienen la delección

estudiada pero si el 2,3%. En el estadio C hay 80 tumores de los cuales el 5% ha sufrido delección en la región 9A del gen EphB2 y el 95% no. En el estadio D se encuentran 70 tumores, de ellos el 97,1% no son portadores de la delección estudiada pero si el 2,9%.

Del análisis de la delección y la localización tumoral concluimos que hay correlación entre ellos estadísticamente significativa ($p < 0,001$). En el colon proximal se localizan 104 tumores, de los cuales el 9,6% son portadores de delección en la región 9A del gen EphB2 y el 90,4% no la tienen. En el colon distal se localizan 100 de los tumores estudiados, ninguno de ellos ha sufrido la delección estudiada. Por último 119 tumores están localizados en el recto y ninguno de ellos tiene delección en esa región del gen. Es decir que todos los tumores que tienen delección en la región 9A del gen EphB2 se localizan en el colon proximal (Gráfico 20).

Tampoco observamos una asociación estadísticamente significativa entre delección en la región 9A y el tipo histológico ($p = 0,21$). De los 295 adenocarcinomas sólo el 2,7% tiene la delección, el 97,3% no la tiene. Los tumores mucoides son 28, el 7,1% de ellos son portadores de la alteración génica y el 92,9% no lo es.

Por último tampoco observamos una correlación estadísticamente significativa respecto a la clasificación de Grinnell³⁷⁹ del grado de diferenciación del tumor y la alteración génica estudiada ($p = 0,69$). 211 tumores están bien diferenciados, de los cuales el 3,3% han sufrido delección en la región 9A del gen EphB2. En el grupo de moderadamente diferenciados tenemos 65 tumores, un 3,1 % de ellos tiene dicha delección pero no el 96,9% restante. 13 tumores son indiferenciados, de los cuales sólo 7,7% ha sufrido la delección estudiada y el 92,3 % no.

Las características clínicas de los 10 tumores que han sufrido delección en la región 9A del gen EphB2 las resumimos en la tabla 26.

Variable	n° (%)	Delección	No delección	p
Sexo	Hombres 172 (53,25%)	5 (2,9%)	167 (97,1%)	1,00
	Mujeres 151 (46,74%)	5 (3,3%)	146 (96,7%)	
Edad	>70 años 169 (52,3%)	7 (4,1%)	162 (95,9%)	0,34
	≥ 70 años 154 (47,7%)	3 (1,9%)	151 (98,1%)	
Dukes	A+B 173 (53,5%)	4 (2,3%)	169 (97,7%)	0,51
	C 80 (24,8%)	4 (5%)	76 (95,0%)	
	D 70 (21,7%)	2 (2,9%)	68 (97,1%)	
Localización	Colon proximal 104 (32,2%)	10 (9,6%)	94 (90,4%)	< 0,001
	Colon distal 100 (31,0%)	0 (0%)	100 (100%)	
	Recto 119 (36,8%)	0 (0%)	119 (100%)	
Tipo histológico	Adenocarcinoma 295 (91,3%)	8 (2,7%)	287 (97,3%)	0,21
	Mucoide 28 (8,7%)	2 (7,1%)	26 (92,9%)	
Grado de diferenciación	I 211 (73,0%)	7 (3,3%)	204 (96,7%)	0,69
	II 65 (22,5%)	2 (3,1%)	63 (96,9%)	
	III 13 (4,5%)	1 (7,7%)	12 (92,3%)	

Tabla 25. Prevalencia de delección en la región 9A del gen EphB2 en relación con las variables clínico patológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de 323 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

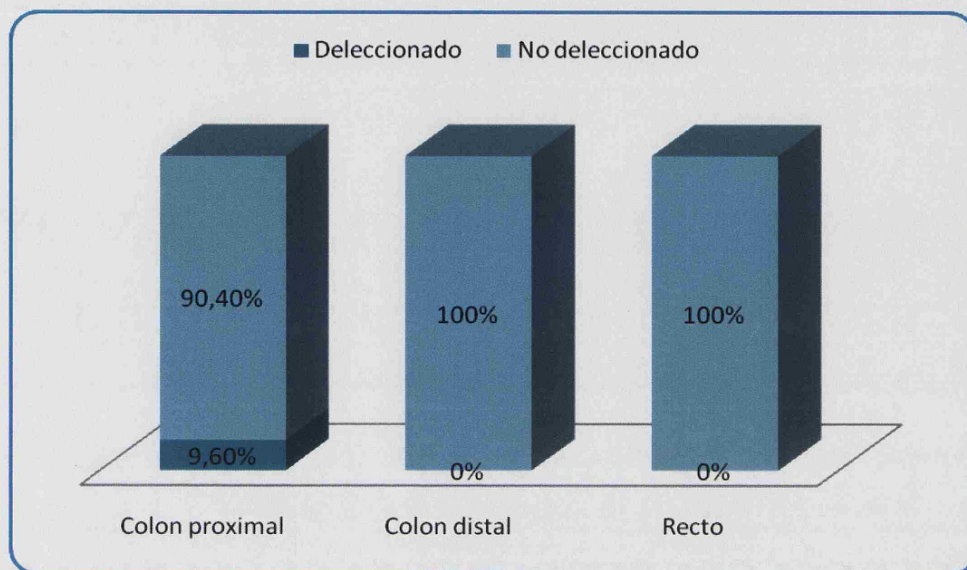


Gráfico 20. Distribución de delección en la región 9A del gen EphB2 según la localización del tumor. Serie de 323 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009).

Paciente	Edad	Histología	Localización	Estadio Dukes	Grado de diferenciación	Recidiva	Muerte	Seguimiento (85meses)
1	85	Adenocarcinoma	Colon proximal	D	I	No	Si	46,9
2	80	Adenocarcinoma	Colon proximal	A+B	I	No	No	31,57
3	37	Adenocarcinoma	Colon proximal	A+B	I	No	No	0,57
4	95	Adenocarcinoma	Colon proximal	C	III	No	No	32,03
5	84	Adenocarcinoma	Colon proximal	C	II	No	No	59,07
6	72	Adenocarcinoma	Colon proximal	C	II	No	No	83,6
7	85	Adenocarcinoma	Colon proximal	A+B	I	No	Si	2,17
8	72	Adenocarcinoma	Colon proximal	A+B	I	No	No	49,87
9	61	Mucinoso	Colon proximal	D	I	Si	Si	49,27
10	64	Mucinoso	Colon proximal	C	I	Si	Si	38,63

Tabla 26. Características clínicas de los 10 tumores portadores de delección en la región 9A del gen EphB2.

VII. EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA COLORRECTAL ESPORÁDICO. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA GLOBAL

VII.A. Estudio de la supervivencia global

El estudio de la SG se ha realizado sólo con los pacientes que fallecieron a causa del tumor. Cuando realizamos el estudio 116 (33,6%) pacientes habían fallecido como consecuencia del tumor y 39 (11,3%) fallecieron por otras causas. En uno de los pacientes (0,3%) no pudo determinarse su evolución.

La mediana del tiempo de seguimiento es de 85,43 meses (rango intercuartílico $P_{25}= 51,3$ y $P_{75}= 106,33$). Todos los análisis de la SG quedan referidos a esta mediana.

La SG acumulada de los pacientes a los 85,43 meses es de 62% (figura 14).

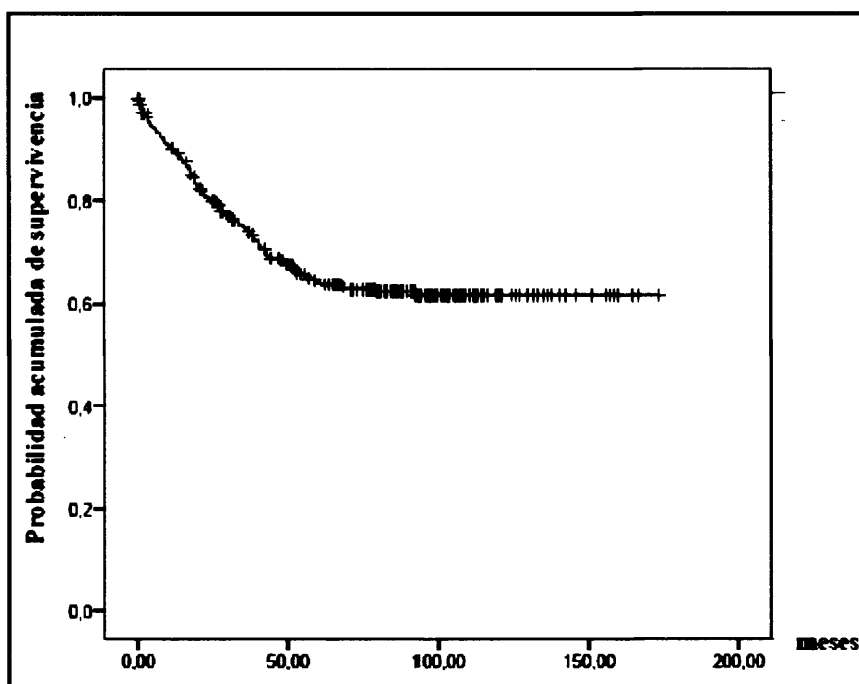


Figura 14. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con cáncer colorrectal. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)

VII.B. Análisis univariante de la probabilidad acumulada de fallecer de los pacientes con cáncer colorrectal en relación con las variables clínico-patológicas y con los factores pronóstico clásicos

Hemos analizado los factores pronóstico clásicos y las características clínico-patológicas con la SG de los pacientes con CCR. También hemos estudiado el riesgo de fallecer que presentan estos pacientes (tabla 27)

Ninguna de las variables clínico patológicas analizadas son factores pronóstico de CCR.

Dentro de los factores pronóstico clásicos ni la localización del tumor ni el tipo histológico presentan significación pronóstica respecto a la SG. Sin embargo el estadio de Dukes y el grado de diferenciación muestran significación pronóstica respecto a la SG.

El estadio D tiene un incremento relativo de la tasa de mortalidad de 3,36 veces frente al estadio A+B. El estadio C tiene un incremento relativo de la tasa de mortalidad de 20,20 veces frente al estadio A+B ($p < 0,001$) (figura 15). Los tumores moderadamente diferenciados tienen una tasa relativa de mortalidad de 1,57 veces y los indiferenciados de 1,72 frente a los tumores bien diferenciados ($p = 0,02$) (figura 16).

Variable	Categorías	SG (EE) (85meses)	n	HR	IC 95 %	p
Sexo	Hombres	60% (3,9%)	61	1,26	0,87-1,82	0,17
	Mujeres	65% (4,1%)	56			
Edad	> 70	58% (4,1%)	41	1,35	0,93-1,94	0,08
	≤ 70	67% (3,8%)	77			
Estadio	A+B	86% (2,8%)	85	3,36	1,92-5,87	<0,001
	C	61% (5,7%)	28			
	D	8% (3,1%)	5			
Grado de diferenciación	I	65% (3,4%)	87	1,57	1,01-2,43	0,02
	II	55% (6,5%)	16			
	III	48% (15,9%)	4			
Localización del tumor	Proximal	57% (5,4%)	26	1,47	0,95-2,28	0,11
	Distal	60% (5,2%)	35			
	Recto	67% (4,2%)	57			
Tipo histológico	Adenocarcinoma	64% (2,9%)	110	0,61	0,35-1,07	0,17
	Mucoide	44% (10,1%)	8			

Tabla 27. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con las variables clínico-patológicas. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

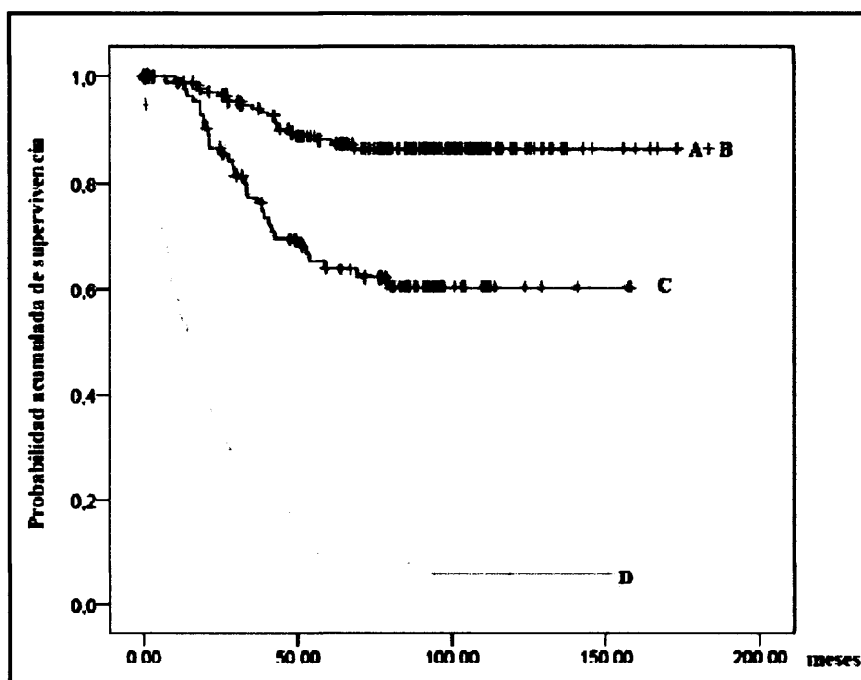


Figura 15. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con cáncer colorrectal según el estadio tumoral. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009).

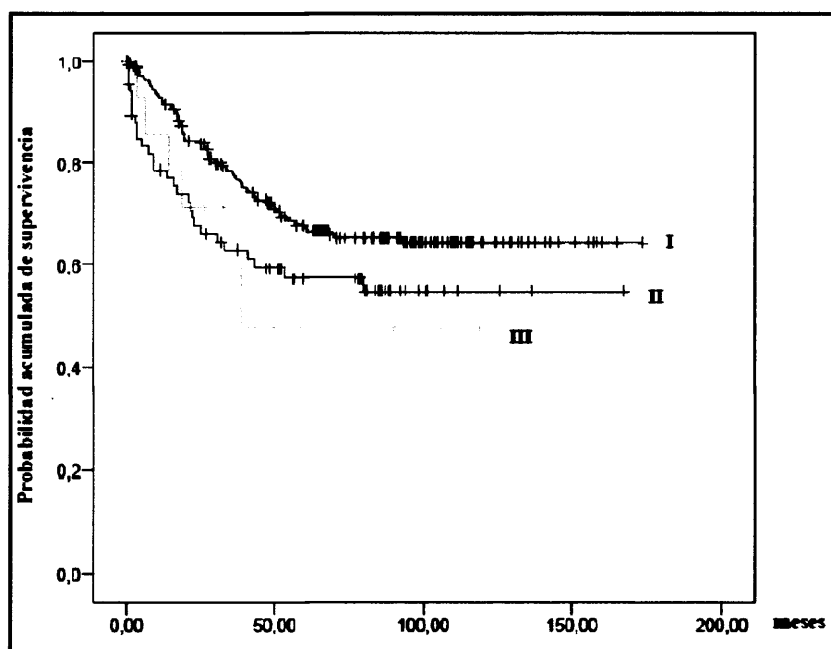


Figura 16. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con cáncer colorrectal según el grado de diferenciación tumoral. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009).

VII.C. Análisis univariante de la probabilidad acumulada de fallecer de los pacientes con CCR en relación con los polimorfismos del gen VEGF

C.1. Polimorfismo VEGF -2578 C/A

Hemos analizado si el polimorfismo VEGF -2578C/A muestra una relación con la SG.

Los distintos genotipos de este polimorfismo no muestran diferencias en la SG. El genotipo A/A tiene una SG de 66%, el A/C de 64% y el C/C de 56% ($p=0,26$) (tabla 28).

Polimorfismo	Genotipos	SG (EE) (85meses)	n	HR	IC 95 %	p
VEGF -2578 C/A	A/A	66% (5,7%)	24	0,78	0,47-1,30	0,26
	A/C	64% (4,0%)	58	0,75	0,49-1,13	
	C/C	56% (5,4%)	35			

Tabla 28. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con el polimorfismo VEGF -2578 C/A. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

ALELOS DEL POLIMORFISMO VEGF-2578 C/A

Hemos estudiado si algún alelo del polimorfismo VEGF -2578 C/A presenta una relación significativa con la SG en los pacientes con CCR (tabla 29).

El alelo C no muestra diferencias significativas entre su presencia o ausencia y la SG ($p=0,96$). La SG en los portadores del alelo C del polimorfismo VEGF- 2578 C/A es de 61% y en los no portadores es de 66%.

Polimorfismo	Alelo	SG (EE) (85meses)	n	HR	IC 95%	p
VEGF -2578 C/A	C	61% (3,2%)	94	1,07	0,68-1,68	0,96
	no C	66% (5,7%)	24			

Tabla 29. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con el alelo C del polimorfismo VEGF -2578 C/A. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

Tampoco observamos una relación significativa con el alelo A y la SG ($p=0,13$). La presencia del alelo muestra una SG del 65% y su ausencia de 56%. (Tabla 30)

Polimorfismo	Alelo	SG (EE) (85meses)	n	HR	IC 95%	p
VEGF -2578 C/A	A	65% (3,3%)	82	0,76	0,51-1,12	0,13
	no A	56% (5,4%)	35			

Tabla 30. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con el alelo A del polimorfismo VEGF -2578 C/A. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

VII.C.1. Polimorfismo VEGF -1154 G/A

Hemos estudiado la relación entre los distintos genotipos del polimorfismo VEGF-1154 G/A y la SG.

El genotipo A/A tiene una tasa de SG de 65% al igual que el G/A y la del G/G es del 59%. No hay diferencias significativas entre estos genotipos y la SG ($p= 0,63$). (Tabla 31)

Polimorfismo	Genotipo	SG (EE) (85meses)	n	HR	IC 95%	p
VEGF -1154 G/A	A/A	65% (5,9%)	23	0,91	0,56-1,48	0,63
	G/A	65% (4,7%)	36	0,85	0,56-1,29	
	G/G	59% (4,4%)	55			

Tabla 31. Análisis univariante de la supervivencia global en relación el polimorfismo VEGF -1154 G/A. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

ALELOS DEL POLIMORFISMO VEGF-1154 G/A

Investigamos la relación entre la SG y los alelos del polimorfismo VEGF-1154 G/A y observamos que no hay diferencias significativas ($p=0,80$). (Tabla 32)

Los portadores del alelo G presentan una SG de 62% y los que no tienen alelo G de 65%.

Polimorfismo	Alelo	SG (EE) (85meses)	n	HR	IC 95%	p
VEGF -1154 G/A	G	62% (3,2%)	94	1,02	0,65-1,60	0,80
	no G	65% (5,9%)	23			

Tabla 32. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con el alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

La presencia del alelo A muestra una SG de 65%; la ausencia de este alelo muestra una SG de 59%. No existen diferencias significativas ($p=0,45$) (Tabla 33)

Polimorfismo	Alelo	SG (EE) (85meses)	n	HR	IC 95%	p
VEGF -1154 G/A	A	65% (3,7%)	62	0,87	0,60-1,26	0,45
	no A	59% (4,4%)	55			

Tabla 33. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con el alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

VII.C.1. Polimorfismo VEGF +936 C/T

Analizamos si el polimorfismo VEGF +936 C/T es un factor pronóstico de SG en el CCR.

Esta alteración genética y la SG no muestran una relación significativa ($p=0,24$). Los homocigotos mutados muestran una SG de 75%, los heterocigotos de 65% y los homocigotos normales de 61% (tabla 34)

Polimorfismo	Genotipos	SG (EE) (85meses)	n	HR	IC 95%	p
VEGF +936 C/T	T/T	75% (21,7%)	3	0,40	0,06-2,86	0,24
	C/T	65% (5,9%)	28	0,80	0,51-1,27	
	C/C	61% (3,3%)	85			

Tabla 34. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con el polimorfismo VEGF +936 C/T. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

ALELOS DEL POLIMORFISMO VEGF +936 C/T

Se ha estudiado si el alelo C o el alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T confieren diferencias significativas en el riesgo de fallecer de estos individuos. Pero ninguno de los dos muestra diferencias ($p=0,26$ y $p=0,14$ respectivamente) (tablas 35 y 36).

La SG de los portadores del alelo C es de 62% y la de los no portadores de 75%.

Polimorfismo	Alelo	SG (EE) (85meses)	n	HR	IC 95%	p
VEGF +936 C/T	C	62% (2,9%)	114	2,40	0,33-17,15	0,26
	no C	75% (2,2%)	3			

Tabla 35. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con el alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

La presencia de alelo T muestra una SG de 66% y la ausencia del mismo de 61%.

Polimorfismo	Alelo	SG (EE) (85meses)	n	HR	IC 95%	p
VEGF +936 C/T	T	66% (5,7%)	32	0,77	0,50-1,21	0,14
	no T	61% (3,3%)	85			

Tabla 36. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con el alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

VII.D. ANÁLISIS UNIVARIANTE DE LA PROBABILIDAD ACUMULADA DE FALLECER DE LOS PACIENTES CON CCR EN RELACIÓN CON DELECCIÓN EN LA REGIÓN 9A DEL GEN EphB2

Hemos estudiado la relación de presencia de delección en la región 9A del gen EphB2 con la SG. Observamos una SG a los 85 meses del 63% en los tumores heterocigotos para la delección en dicho gen (Tabla 37). Estos pacientes tienen un 30% de reducción relativa de la tasa de mortalidad después de 85 meses frente a los pacientes que no tienen dicha alteración génica (HR=0,70; IC95%= 0,17-2,86; p= 0,46) (figura 17).

Variable	Categorías	SG (EE) (85 meses)	n	HR	IC 95%	p
Delección	Deleccionado	63% (21,3%)	0	0,70	0,17-2,86	0,46
	No deleccionado	64% (2,9%)	115			

Tabla 37. Análisis univariante de la supervivencia global en relación con delección en la región 9A del gen EphB2. Serie de 323 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

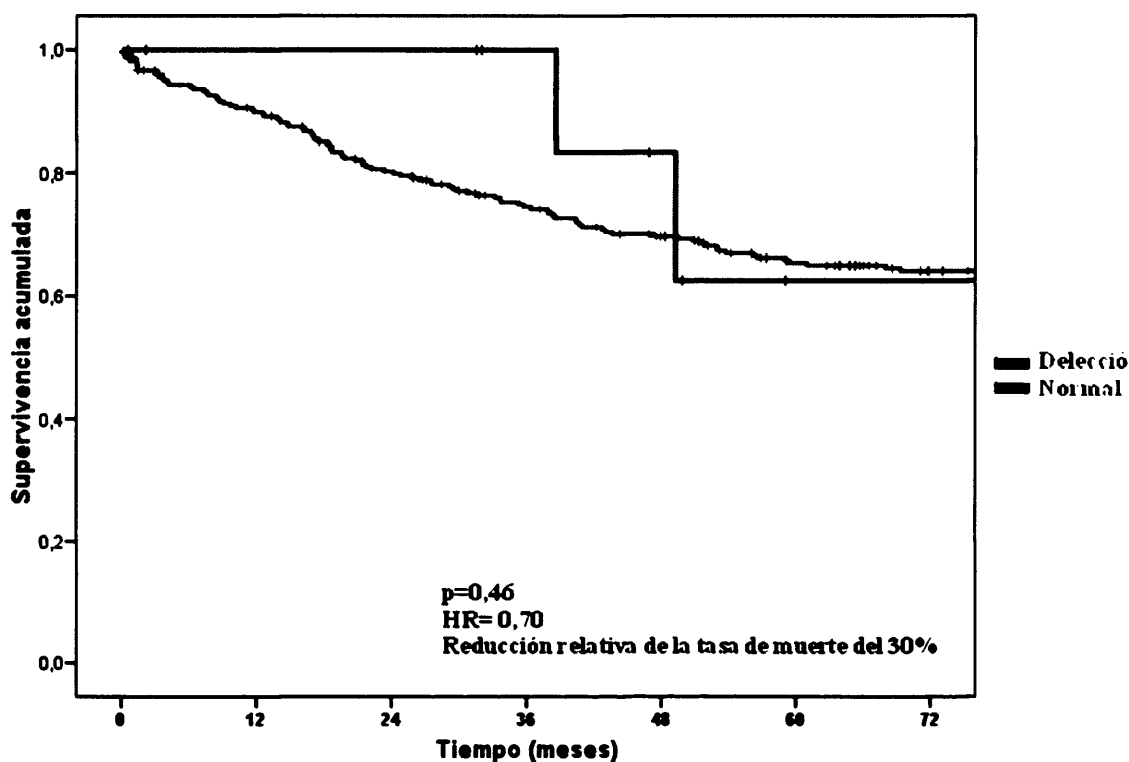


Figura 17. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con cáncer colorrectal según la delección en la región 9A del gen EphB2. Serie de 323 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009).

VII.E. ANÁLISIS ESTRATIFICADO DE LA SUPERVIVENCIA GLOBAL

E.1. Análisis estratificado de la supervivencia global entre los factores pronóstico y el polimorfismo VEGF -2578 C/A

Hemos estudiado la SG de los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y el polimorfismo VEGF -2578 C/A (tabla 38).

En el análisis estratificado respecto al sexo, observamos que la SG a los 85 meses de los hombres homocigotos mutados era del 63%, mientras que es del 61% en los heterocigotos y del 56% en los homocigotos “silvestres” ($p=0,57$). Tampoco observamos diferencias significativas en la SG en las mujeres, las homocigotas mutadas tienen una SG del 69%, las heterocigotas del 68% y las homocigotas “silvestre” del 57% ($p=0,36$).

Respecto a la edad, en el análisis estratificado observamos en los pacientes mayores de 70 años una SG a los 85 meses del 61% en los homocigotos mutados, del 59% en los heterocigotos y del 53% en los “wild tipe” ($p=0,79$). En el grupo de pacientes con 70 años de edad o con edad inferior, la SG a los 85 meses fue del 74% en los homocigotos portadores de la mutación, del 69% en los heterocigotos y del 59% en los homocigotos sin la alteración genética ($p=0,22$).

Tampoco observamos diferencias significativas en el análisis estratificado respecto al estadio de Dukes, los pacientes con tumores en estadio A o B presentaron una SG a los 85 meses del 92% en los pacientes de genotipo AA, del 86% aquellos con genotipo AC y del 84% en los pacientes de genotipo CC ($p=0,69$). La SG de los pacientes en estadio C fue del 60% en los homocigotos AA, del 59% en los heterocigotos AC y del 62% en los homocigotos CC ($p=0,69$). Los pacientes en estadio D homocigotos mutados muestran una SG del 0%, del 13% los heterocigotos y del 4% los homocigotos “silvestre” ($p=0,78$).

Respecto a la localización tumoral el análisis estratificado de la SG nos muestra en los tumores de colon una SG a los 85 meses del 61% en los pacientes con genotipo AA, del 60% en los pacientes con genotipo AC y en aquellos de genotipo CC del 56% ($p=0,72$). En los tumores de recto observamos una SG a los 85 meses del 73% en

pacientes homocigotos AA, del 70% en los heterocigotos AC y del 56% en los homocigotos CC ($p=0,20$).

Del mismo modo, no observamos diferencias significativas al realizar el análisis estratificado de la SG respecto al tipo histológico. En los adenocarcinomas: los pacientes con genotipo AA la SG a los 85 meses es del 72%, del 67% en los pacientes con genotipo AC y del 58% en los pacientes con genotipo CC ($p=0,14$). En el grupo de los tumores mucinosos observamos una supervivencia en los homocigotos mutados del 50%, en los heterocigotos del 40% y del 45% en los homocigotos “silvestres” ($p=0,74$)

Al estudiar el grado de diferenciación, observamos en el grupo de pacientes con tumores de grado I que la SG a los 85 meses es del 71% en los homocigotos AA, del 67% en los heterocigotos AC y del 58% en los homocigotos CC ($p=0,52$). En los pacientes con tumores de grado II se observó una SG del 50% tanto en los pacientes con genotipo AA como genotipo CC y del 62% en aquellos con genotipo AC ($p=0,25$). En el grupo de tumores de grado III la SG de los pacientes homocigotos mutados es del 40%, en los heterocigotos del 50% y del 75% en homocigotos “silvestre” ($p=0,25$).

Variable	Categorías	VEGF -2578 C/A	SG (EE) (85meses)	n	p
Sexo	Hombres	AA	63% (8,3%)	11	0,57
		AC	61% (5,5%)	33	
		CC	56% (7,5%)	16	
	Mujeres	AA	69% (7,9%)	12	0,36
		AC	68% (5,9%)	24	
		CC	57% (7,7%)	18	
Edad	> 70	AA	61% (7,5%)	10	0,79
		AC	59% (6,2%)	17	
		CC	53% (8,0%)	13	
	≤ 70	AA	74% (8,5%)	14	0,22
		AC	69% (5,3%)	40	
		CC	59% 7,3(%)	22	

Dukes	A+B	AA	92% (4,2%)	19	0,69
		AC	86% (4,0%)	44	
		CC	84% (6,1%)	22	
	C	AA	60% (12,8%)	5	0,69
		AC	59% (8,5%)	10	
		CC	62% (10,0%)	12	
	D	AA	0% (0%)	0	0,78
		AC	13% (6,2%)	4	
		CC	4% (4,4%)	1	
Localización	Colon	AA	61% (7,7%)	11	0,72
		AC	60% (5,5%)	29	
		CC	56% (6,8%)	21	
	Recto	AA	73% (8,2%)	13	0,20
		AC	70% (5,8%)	29	
		CC	56% (8,8%)	14	
Histología	Adenocarcinoma	AA	72% (5,8%)	24	0,14
		AC	67% (4,2%)	52	
		CC	58% (5,6%)	34	
	Mucinoso	AA	50% (35,4%)	0	0,74
		AC	40% (12,6%)	6	
		CC	45% (18,8%)	1	
Grado de diferenciación	I	AA	71% (6,7%)	18	0,52
		AC	67% (4,9%)	40	
		CC	58% (6,5%)	27	
	II	AA	50% (13,4%)	4	0,25
		AC	62% (9,0%)	9	
		CC	50% (12,5%)	3	
	III	AA	40% (21,9%)	0	0,25
		AC	50% (25,0%)	2	
		CC	75% (21,7%)	2	

Tabla 38. Análisis estratificado de la supervivencia global en el estudio del polimorfismo VEGF - 2578 C/A. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

ALELOS DEL POLIMORFISMO VEGF-2578 C/A

1. Alelo C del polimorfismo VEGF-2578 C/A

Hemos realizado un análisis estratificado de la SG entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y la presencia o ausencia del alelo C del polimorfismo VEGF -2578 C/A (tabla 39).

En el análisis estratificado de la SG respecto al sexo observamos en los hombres una SG a los 85 meses del 59% en los portadores del alelo C VEGF-2578 C/A y del 63% en los no portadores ($p=0,81$). En las mujeres observamos que las portadoras del alelo C VEGF-2578 C/A tienen una SG del 64% y del 69% las que no tienen este alelo ($p=0,92$).

Respecto a la edad, el análisis estratificado de la SG nos muestra en el grupo de pacientes mayores de 70 años una SG a los 85 meses del 56% en los portadores del alelo C VEGF-2578 C/A y del 61% en aquellos que no tienen este alelo ($p=0,75$). En los menores de 70 años o con esa edad portadores del alelo C VEGF-2578 C/A observamos una SG del 65% y del 74% en los no portadores del alelo ($p=0,54$).

Tampoco hemos observado diferencias estadísticamente significativas en el análisis estratificado de la SG y el estadio de Dukes. Aquellos pacientes portadores del alelo C VEGF-2578 C/A en estadio A+B muestran una SG del 85% y del 92% en aquellos en los que este alelo está ausente ($p=0,40$). En el grupo de pacientes en estadio C la SG es del 60% tanto para lo que tienen el alelo C VEGF-2578 C/A como para los que no ($p=0,50$). En el estadio D los enfermos portadores del alelo C VEGF-2578 C/A tienen una SG del 10% y del 0% en los no portadores ($p=0,60$).

El análisis estratificado de la SG respecto a la localización tumoral la SG muestra una SG a los 85 meses en los tumores del colon del 59% en los pacientes que

tienen el alelo C VEGF-2578 C/A y del 61% para los no portadores ($p=0,65$). En los tumores del recto en los pacientes portadores de este alelo observamos una SG a los 85 meses del 65% y del 73% para los no portadores ($p=0,62$).

Respecto a la histología el análisis estratificado de la SG muestra una SG a los 85 meses en el grupo de los adenocarcinomas del 63% en los portadores del alelo C VEGF -2578 A/C y del 67% en los no portadores ($p=0,87$). En los tumores mucinosos la SG es del 41% en los portadores de este alelo y del 50% en los pacientes sin el alelo C VEGF -2578 C/A ($p=0,73$).

En el análisis estratificado de la SG con el grado de diferenciación observamos que los pacientes con grado I y portadores del alelo C VEGF-2578 C/A muestran una SG a los 85 meses del 63% y del 72% en los no portadores ($p=0,55$). En el grado de diferenciación II los no portadores del alelo C VEGF-2578 C/A muestran una SG del 58% y del 50% en los portadores ($p=0,63$). En el grupo de pacientes con tumores en grado III la SG es del 60% en los portadores del alelo C VEGF-2578 C/A y del 40% en los no portadores ($p=0,11$).

Variable	Categorías	Alelo C	SG (85meses)	n	p
Sexo	Hombres	C	59% (4,5%)	50	0,81
		no C	63% (8,3%)	11	
	Mujeres	C	64% (4,7%)	43	0,92
		no C	69% (7,9%)	13	
Edad	> 70	C	56% (4,9%)	31	0,75
		no C	61% (7,5%)	10	
	≤ 70	C	65% (4,3%)	62	0,54
		no C	74% (8,5%)	14	
Dukes	A+B	C	85% (3,4%)	66	0,40
		no C	92% (4,2%)	19	
	C	C	60% (6,4%)	23	0,50
		no C	60% (12,8%)	5	
	D	C	10% (4,1%)	5	0,60
		no C	0% (0%)	0	
Localización	Colon	C	59% (4,3%)	50	0,65
		no C	61% (7,7%)	22	
	Recto	C	65% (4,9%)	43	0,62
		no C	73% (8,2%)	13	
Histología	Adenocarcinoma	C	63% (3,4%)	86	0,87
		no C	67% (5,8%)	24	
	Mucinoso	C	41% (10,8%)	7	0,73
		no C	50% (35,4%)	0	
Grado de diferenciación	I	C	63% (3,9%)	67	0,55
		no C	72% (6,7%)	18	
	II	C	58% (7,4%)	12	0,63
		no C	50% (13,4%)	4	
	III	C	60% (18,5%)	4	0,11
		no C	40% (21,9%)	0	

Tabla 39. Análisis estratificado de la supervivencia global en relación con el alelo C del polimorfismo VEGF -2578 C/A. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

2. Alelo A del polimorfismo VEGF-2578 C/A

El análisis estratificado de la SG entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y el alelo A del polimorfismo VEGF -2578 C/A se resume en la tabla 40.

Respecto al sexo el análisis estratificado de la SG muestra que en los hombres la SG a los 85 meses es del 62% en los portadores del alelo A VEGF-2578 C/A y del 57% en los no portadores ($p=0,36$). En las mujeres observamos que las portadoras del alelo A VEGF-2578 C/A tienen una SG del 68% y del 57% las que no portadoras ($p=0,17$).

El análisis estratificado de la SG respecto a la edad nos muestra en el grupo de pacientes mayores de 70 años una SG a los 85 meses del 60% en los portadores del alelo A VEGF-2578 C/A y del 53% en aquellos que no tienen este alelo ($p=0,66$). En los enfermos de 70 años o con una edad inferior menores portadores del alelo A VEGF-2578 C/A observamos una SG del 70% y del 59% en los no portadores del alelo ($p=0,08$).

Respecto al análisis estratificado de la SG y el estadio de Dukes en los pacientes portadores del alelo A VEGF-2578 C/A en estadio A+B observamos una SG del 88% y del 84% en aquellos en los que este alelo está ausente ($p= 0,64$). Los pacientes en estadio C la SG es del 59% para los que tienen el alelo A VEGF-2578 C/A y en los no portadores la SG es del 62% ($p= 0,77$). En el estadio D los portadores del alelo A VEGF-2578 C/A muestran una SG del 5% al igual que en los no portadores ($p= 0,82$).

No observamos diferencias estadísticamente significativas al realizar el análisis estratificado de la SG respecto a la localización tumoral. Observamos una SG a los 85 meses en los tumores del colon del 60% en los pacientes que tienen el alelo A VEGF-2578 C/A y del 56% para los no portadores ($p= 0,64$). En los tumores del recto los

pacientes portadores de este alelo muestran una SG a los 85 meses del 71% y del 56% para los no portadores ($p=0,07$).

Respecto a la histología: el grupo de los adenocarcinomas muestra una SG a los 85 meses del 67% en los portadores del alelo A VEGF -2578 A/C y del 58% en los no portadores ($p=0,07$). En los tumores mucinosos la SG es del 41% en los portadores de este alelo y del 45% en los no portadores ($p=0,45$).

Respecto al grado de diferenciación, el análisis estratificado de la SG nos muestra en los pacientes con grado I portadores del alelo A VEGF-2578 C/A una SG a los 85 meses del 68% y del 58% en los no portadores ($p=0,27$). En los pacientes con grado de diferenciación II portadores del alelo A VEGF-2578 C/A observamos una SG del 58% y del 50% en los no portadores ($p=0,17$). En el grupo de pacientes con tumores en grado III la SG es del 35% en los portadores del alelo A VEGF-2578 C/A y del 75% en los no portadores ($p=0,80$).

Variable	Categorías	Alelo A	SG (EE) (85meses)	n	p
Sexo	Hombres	A	62% (4,6%)	44	0,36
		no A	57% (7,5%)	17	
	Mujeres	A	68% (4,8%)	38	0,17
		no A	57% (7,7%)	18	
Edad	> 70	A	60% (4,8%)	28	0,66
		no A	53% (8,0%)	13	
	≤ 70	A	70% (4,5%)	54	0,08
		no A	59% (7,3%)	22	
Dukes	A+B	A	88% (3,1%)	63	0,64
		no A	84% (6,1%)	22	
	C	A	59% (7,1%)	15	0,77
		no A	62% (10,0%)	12	
	D	A	5% (4,6%)	4	0,82
		no A	5% (4,4%)	1	
Localización	Colon	A	60% (4,5%)	40	0,64
		no A	56% (6,8%)	21	
	Recto	A	71% (4,8%)	42	0,07
		no A	56% (8,8%)	14	
Histología	Adenocarcinoma	A	67% (3,4%)	76	0,07
		no A	58% (5,6%)	34	
	Mucinoso	A	41% (11,9%)	6	0,45
		no A	45% (18,8%)	1	
Grado de diferenciación	I	A	68% (4,0%)	58	0,27
		no A	58% (6,5%)	27	
	II	A	58% (7,6%)	13	0,17
		no A	50% (12,5%)	3	
	III	A	35% (18,9%)	2	0,80
		no A	75% (21,7%)	2	

Tabla 40. Análisis estratificado de la supervivencia global en relación con el alelo A del polimorfismo VEGF -2578 C/A. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

E.2. Análisis estratificado de la supervivencia global entre los factores pronóstico y el polimorfismo VEGF -1154 G/A

Hemos realizado un análisis estratificado de la SG entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y el polimorfismo VEGF -1154 G/A (tabla 41).

Respecto al sexo de los pacientes, observamos que los hombres homocigotos AA muestran una SG del 70%, del 55% para los heterocigotos y del 57% en los homocigotos GG ($p=0,42$). En las mujeres homocigotas AA observamos una SG del 56%, del 72% en las heterocigotas y del 63% en las homocigotas GG ($p=0,09$).

Cuando se estratificó por la edad de los pacientes, observamos que en el grupo de pacientes mayores de 70 años la SG fue del 55% en pacientes con genotipo AA, del 63% con el genotipo AG y del 54% con genotipo GG ($p=0,52$). En los menores de 70 años o de esa edad la SG fue del 74% en los homocigotos mutados, del 66% en los heterocigotos y del 64% en homocigotos “silvestre” ($p=0,92$).

En el análisis estratificado con respecto al estadio de Dukes observamos una SG a los 85 meses en los pacientes con tumores en estadio A o B del 94% en aquellos homocigotos mutados, del 80% los heterocigotos y del 88% en los homocigotos “silvestre” ($p=0,23$). La SG de los pacientes en estadio C es del 58% en el caso de los pacientes homocigotos AA, del 61% en los heterocigotos AG y del 59% en los homocigotos GG ($p=0,50$). Los pacientes con tumores en estadio D muestran una SG del 0% en aquellos que presentaban genotipo AA, del 18% los de genotipo AG y del 6% los de genotipo GG ($p=0,67$).

En el análisis estratificado realizado respecto a la localización tumoral observamos que en los cánceres de colon la SG de los pacientes homocigotos mutados

era del 54%, la de los heterocigotos del 60% y la de los homocigotos “silvestre” del 61% ($p=0,64$). En el grupo de pacientes con tumores localizados en recto, la SG fue: en los homocigotos mutados del 77%, en los heterocigotos del 70% y en los homocigotos “silvestre” del 58% ($p=0,36$).

Al estratificar por tipo histológico observamos que en los adenocarcinomas la SG es del 66% en los pacientes que presentaban genotipo AA, del 65% en aquellos que presentaban genotipo AG y del 62% en los de genotipo GG ($p=0,73$). En los pacientes con tumores mucinosos la SG que observamos es del 33% en los homocigotos mutados, en los heterocigotos del 57% y del 36% en los homocigotos “silvestre” ($p=0,77$).

Al estudiar el grado de diferenciación, observamos que el grupo de pacientes con tumores de grado I muestran una SG del 76% en el caso de genotipo AA, del 63% en el caso de genotipo AG y del 62% cuando el genotipo es GG ($p=0,79$). En el grupo de pacientes con tumores de grado II observamos una SG del 60% en el caso de los homocigotos mutados, del 56% en los heterocigotos y del 53% en los homocigotos “silvestre” ($p=0,65$). En el caso de los tumores grado III la SG de los pacientes de genotipo AA es del 50% al igual que en los de genotipo AG y del 53% en el caso de que presenten genotipo GG ($p=0,51$).

Variable	Categorías	VEGF -1154 G/A	SG (EE) (85meses)	n	p
Sexo	Hombres	AA	70% (7,3%)	14	0,42
		AG	55% (7,1%)	20	
		GG	57% (6,0%)	26	
	Mujeres	AA	56% (9,7%)	9	0,09
		AG	72% (6,1%)	19	
		GG	63% (6,4%)	28	

Edad	> 70	AA	55% (8,8%)	6	0,52
		AG	63% (6,4%)	17	
		GG	54% (6,8%)	23	
	≤ 70	AA	74% (7,5%)	17	0,92
		AG	66% (6,9%)	22	
		GG	64% (5,7%)	37	
Dukes	A+B	AA	94% (4%)	16	0,23
		AG	80% (5,2%)	3	
		GG	88% (4,2%)	38	
	C	AA	58%(12,2%)	7	0,50
		AG	61% (10%)	5	
		GG	59% (8,8%)	15	
	D	AA	0% (0%)	0	0,67
		AG	18% (8,7%)	3	
		GG	6% (4,2%)	2	
Localización	Colon	AA	54% (8,3%)	12	0,64
		AG	60% (6,5%)	17	
		GG	61% (5,5%)	32	
	Recto	AA	77% (7,6%)	11	0,36
		AG	70% (6,8%)	22	
		GG	58% (7,2%)	23	
Histología	Adenocarcinoma	AA	66% (5,8%)	23	0,73
		AG	65% (4,9%)	42	
		GG	62% (4,6%)	53	
	Mucinoso	AA	33%(27,2%)	1	0,77
		AG	57%(16,6%)	4	
		GG	36%(13,9%)	2	
Grado de diferenciación	I	AA	76% (6,7%)	16	0,79
		AG	63% (5,9%)	27	
		GG	62% (5,2%)	42	
	II	AA	60%(12,6%)	4	0,65
		AG	56%(10,9%)	5	
		GG	53%(10,5%)	7	
	III	AA	50%(20,4%)	1	0,51
		AG	50%(24,5%)	1	
		GG	53%(24,8%)	2	

Tabla 41. Análisis estratificado de la supervivencia global en el estudio del polimorfismo VEGF - 1154 G/A. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

ALELOS DEL POLIMORFISMO VEGF-1154 G/A

1. Alelo G del polimorfismo VEGF-1154 G/A

Se ha estudiado la SG de los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y la presencia o ausencia del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A (tabla 42).

Al estratificar según el sexo de los pacientes, se observó que los hombres que no portaban el alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A tenían una mayor SG que los portadores del alelo, las SG son del 70% y del 56%, respectivamente ($p=0,18$). En las mujeres hay que destacar que las portadoras del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A muestran una mayor SG (67%) que las no portadoras ($SG=56\%$) ($p=0,05$).

En relación a la edad de los pacientes, en aquellos con edad mayor a 70 años la SG a los 85 meses es del 59% en los portadores del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 55% en los no portadores ($p=0,71$). En el grupo de pacientes de 70 años o menores la SG de los portadores del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A es del 65% y del 75% para los que no presentan este alelo ($p=0,85$).

Respecto al análisis estratificado del estadio de Dukes, en aquellos pacientes con tumores en estadio A o B presentaron una SG a los 85 meses del 85% en los pacientes que tenían el alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 94% en aquellos que no presentaban este alelo ($p=0,20$). En el grupo de pacientes con tumores en estadio C la SG a los 85 meses fue del 60% en el caso de los portadores del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 58% en aquellos que no presentaban dicho alelo ($p=0,28$). En los tumores en estadio D observamos una SG del 10% para los portadores

del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 0% para los no portadores ($p=0,40$)

Con respecto a la localización tumoral se observó en los tumores localizados en el colon una SG a los 85 meses de los pacientes portadores del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A del 50% y del 54% en los no portadores ($p=0,36$). En el grupo de pacientes con tumores localizados en recto la SG fue del 64% para aquellos que presentan el alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 77% para aquellos que no lo tienen ($p=0,44$).

En el análisis estratificado del tipo histológico observamos que en adenocarcinomas la SG a los 85 meses en los pacientes portadores del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A fue del 63% y del 66% para los que no lo presentaban ($p=0,79$). En el caso de los tumores mucinosos los portadores del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A muestran una SG del 44% y del 33% aquellos que no lo tienen ($p=0,97$).

Tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas al estudiar el grado de diferenciación, en el caso de pacientes con tumores de grado I a SG de los portadores del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A es del 63% y del 76% en el caso de los no portadores ($p=0,50$). En el caso de los tumores de grado II la SG es del 54% para los portadores del alelo G del polimorfismo VEGF -1154G/A y del 60% para los que no lo presentan ($p=0,70$). En los tumores de grado III se observa una SG del 53% para los pacientes que tienen el alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 50% para los que no lo tienen ($p=0,30$).

Variable	Categorías	Alelo G	SG (EE) (85meses)	n	p
Sexo	Hombres	G	56% (6,6%)	47	0,18
		no G	70% (7,3%)	14	
	Mujeres	G	67% (4,5%)	47	0,05
		no G	56% (4,7%)	9	
Edad	> 70	G	59% (4,7%)	35	0,71
		no G	55% (8,8%)	6	
	≤ 70	G	65% (4,4%)	56	0,85
		no G	75% (7,5%)	17	
Dukes	A+B	G	85% (3,4%)	69	0,20
		no G	94% (4,0%)	16	
	C	G	60% (6,5%)	20	0,28
		no G	58% (12,2%)	7	
	D	G	10% (4,3%)	5	0,40
		no G	0% (0%)	0	
Localización	Colon	G	50% (4,2%)	49	0,36
		no G	54% (8,3%)	12	
	Recto	G	64% (5,0%)	45	0,44
		no G	77% (7,6%)	11	
Histología	Adenocarcinoma	G	63% (3,3%)	88	0,79
		no G	66% (5,9%)	22	
	Mucinoso	G	44% (10,8%)	6	0,97
		no G	33% (2,72%)	1	
Grado de diferenciación	I	G	63% (3,9%)	69	0,50
		no G	76% (6,7%)	16	
	II	G	54% (7,7%)	12	0,70
		no G	60% (12,6%)	4	
	III	G	53% (20,4%)	3	0,30
		no G	50% (20,4%)	3	

Tabla 42. Análisis estratificado de la supervivencia global en relación con el alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

2. Alelo A del polimorfismo VEGF-1154 G/A

El análisis estratificado de la SG de los pacientes con CCR entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y la presencia o ausencia del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A se resume en la tabla 43.

Cuando estratificamos por el sexo de los pacientes, observamos que en los hombres portadores del alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A era del 62% y del 57% en los no portadores ($p=0,44$). En las mujeres la SG es del 69% en aquellas que presentan el alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 63% en ausencia del mismo alelo ($p=0,85$).

Respecto a la edad, en los pacientes mayores de 70 años se observó una SG del 60% en los portadores del alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 54% en aquellos que no lo presentaban ($p=0,38$). En el caso de los pacientes con edad inferior a 70 años o con esa edad, la SG fue del 69% en los pacientes que presentaban el alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 64% en los no portadores del alelo ($p=0,68$).

Con respecto a la estratificación según el estadio de Dukes, los pacientes con tumores en estadio A o B presentan una SG del 86% en los que tienen el alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 88% en los que carecen de ese alelo ($p=0,65$). La SG a los 85 meses de los pacientes en estadio C portadores del alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A es del 60% y del 59% para los pacientes en estadio C no portadores del alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A ($p=0,99$). En el caso de los pacientes con tumores en estadio D observamos una SG del 10% en los pacientes con el alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 6% para los que carecen de ese alelo ($p=0,86$).

En relación a la estratificación por la localización del tumor, observamos que en el cáncer de colon la SG es del 58% en los que presentan el alelo A del polimorfismo VEGF

-1154 G/A y del 60% para los no lo tienen ($p=0,86$). En el caso de los pacientes con tumores de recto, la SG de los portadores del alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A es del 72% y del 58% en los no portadores ($p=0,16$).

Con respecto a la estratificación por el tipo histológico observamos que en los adenocarcinomas la SG a los 85 meses es del 66% en los pacientes con alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 62% en los no portadores ($p=0,58$). En el caso de los pacientes con tumores de tipo histológico mucinoso la SG fue del 50% en los portadores del alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 36% en el caso de los no portadores ($p=0,51$).

En el análisis estratificado según el grado de diferenciación, observamos que los pacientes con tumores grado I tenían una SG del 68% en los pacientes que portan el alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 62% en los no portadores ($p=0,85$). En los pacientes con tumores grado II observamos una SG en los pacientes portadores del alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A del 58% y en aquellos no portadores del 52% ($p=0,30$). En el grupo de pacientes con tumores grado III la SG es del 44% para aquellos que presentan el alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 53% para los no portadores ($p=0,87$).

Variable	Categorías	Alelo A	SG (EE) (85meses)	n	p
Sexo	Hombres	A	62% (5,2%)	34	0,44
		no A	57% (6,0%)	27	
	Mujeres	A	69% (5,2%)	28	0,85
		no A	63% (6,4%)	28	
Edad	> 70	A	60% (5,2%)	23	0,38
		no A	54% (6,8%)	18	
	≤ 70	A	69% (5,2%)	39	0,68
		no A	64% (5,7%)	37	
Dukes	A+B	A	86% (3,6%)	47	0,65
		no A	88% (4,2%)	38	
	C	A	60% (7,7%)	12	0,99
		no A	59% (8,8%)	15	
	D	A	10% (5,2%)	3	0,86
		no A	6% (4,2%)	2	
Localización	Colon	A	58% (5,1%)	29	0,86
		no A	60% (5,5%)	37	
	Recto	A	72% (5,1%)	50	0,16
		no A	58% (7,2%)	23	
Histología	Adenocarcinoma	A	66% (3,8%)	57	0,58
		no A	62% (4,6%)	53	
	Mucinoso	A	50% (14,4%)	5	0,51
		no A	36% (13,9%)	2	
Grado de diferenciación	I	A	68% (4,5%)	43	0,85
		no A	62% (5,2%)	42	
	II	A	58% (8,2%)	9	0,30
		no A	52% (10,6%)	6	
	III	A	44% (21,0%)	2	0,87
		no A	53% (24,8%)	2	

Tabla 43. Análisis estratificado de la supervivencia global en relación con el alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

E.3. Análisis estratificado de la supervivencia global entre los factores pronóstico y el polimorfismo VEGF +936 C/T

Hemos estudiado la SG de los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y el polimorfismo VEGF -2578 C/A (tabla 44).

Al estudiar el sexo, observamos que la SG a los 85 meses de los hombres homocigotos mutados era del 100%, mientras que es del 60% en los heterocigotos y en los homocigotos “silvestres” ($p=0,48$). En las mujeres la SG de las homocigotas mutadas es del 67%, en las heterocigotas es del 75% y para las homocigotas “silvestre” del 63% ($p=0,35$).

En cuanto a la edad, en el análisis estratificado observamos en los pacientes mayores de 70 años una SG a los 85 meses del 100% en los homocigotos TT, del 58% en los heterocigotos TC y del 56% en los homocigotos CC ($p=0,27$). En el grupo de pacientes con edad inferior a los 70 años o con esa edad, la SG a los 85 meses fue del 0% en los homocigotos mutados, del 71% en los heterocigotos y del 66% en los homocigotos sin la alteración genética ($p=0,51$).

En el análisis estratificado respecto al estadio de Dukes, en los pacientes con tumores en estadio A o B observamos una SG a los 85 meses del 100% en los pacientes homocigotos TT, del 85% los heterocigotos TC y del 87% en los pacientes homocigotos CC ($p=0,78$). La SG de los pacientes en estadio C fue del 50% en los pacientes de genotipo TT, del 49% en los de genotipo TC y del 65% en los de genotipo CC ($p=0,42$). Hay que destacar que los pacientes en estadio D muestran una SG del 0% en los heterocigotos y del 9% en homocigotos “silvestre”. ($p=0,85$).

Respecto a la localización tumoral el análisis estratificado de la SG nos muestra en los tumores de colon una SG a los 85 meses del 100% en los pacientes homocigotos TT, del 62% en los heterocigotos TC y del 58% en los homocigotos CC ($p=0,50$). En el grupo de pacientes con los tumores localizados en el recto observamos una SG a los 85 meses del 67% en pacientes homocigotos TT, del 70% en los heterocigotos TC y del 66% en los homocigotos CC ($p=0,42$).

Tampoco observamos diferencias significativas en el análisis estratificado respecto al tipo histológico. En los adenocarcinomas: en los pacientes homocigotos mutados la SG a los 85 meses es del 67%, del 66% en los pacientes con heterocigotos y del 64% en los pacientes homocigotos “silvestre” ($p=0,42$). En el caso de los pacientes con tumores mucinosos observamos una SG en los homocigotos TT del 100%, en los heterocigotos TC del 57% y del 29% en los homocigotos CC ($p=0,35$).

Respecto al grado de diferenciación, observamos en el grupo de pacientes con tumores de grado I que la SG a los 85 meses es del 75% en los pacientes de genotipo TT, del 66% en los pacientes de genotipo TC y del 65% en los de los genotipo CC ($p=0,44$). En los pacientes con tumores de grado II se observó una SG del 64% para los heterocigotos TC y del 54% en los homocigotos CC ($p=0,86$). En el grupo de tumores de grado III la SG de los pacientes heterocigotos es del 50% y del 48% en homocigotos “silvestre” ($p=0,33$).

Variable	Categorías	VEGF +936 C/T	SG (EE) (85meses)	n	p
Sexo	Hombres	TT	100% (---)	1	0,48
		TC	60% (7,7%)	17	
		CC	60% (4,6%)	43	
	Mujeres	TT	67% (27,7%)	2	0,35
		TC	75% (8,8%)	12	
		CC	63% (4,6%)	42	

Edad	> 70	TT	100% (---)	4	0,27
		TC	58% (9,0%)	8	
		CC	56% (4,8%)	42	
	≤ 70	TT	0% (0,0%)	0	0,51
		TC	71% (7,7%)	21	
		CC	66% (4,4%)	55	
Dukes	A+B	TT	100% (---)	3	0,78
		TC	85% (5,8%)	22	
		CC	87% (3,2%)	61	
	C	TT	50% (3,5%)	1	0,42
		TC	49% (11,5%)	7	
		CC	65% (6,7%)	19	
	D	TT	---		0,85
		TC	0% (0,0%)	0	
		CC	9% (3,8%)	5	
Localización	Colon	TT	100% (---)	2	0,50
		TC	62% (7,8%)	16	
		CC	58% (4,4%)	44	
	Recto	TT	67% (27,2%)	2	0,42
		TC	70% (9%)	13	
		CC	66% (4,9%)	41	
Histología	Adenocarcinoma	TT	67% (27,2%)	2	0,42
		TC	66% (6,2%)	25	
		CC	64% (3,3%)	83	
	Mucinoso	TT	100% (---)	1	0,35
		TC	57% (18,7%)	4	
		CC	29% (12,5%)	2	
Grado de diferenciación	I	TT	75% (21,7%)	3	0,44
		TC	66% (7,0%)	19	
		CC	65% (4,0%)	63	
	II	TT	---		0,86
		TC	64% (16,9%)	4	
		CC	54% (7,1%)	12	
	III	TT	---		0,33
		TC	50% (35,4%)	1	
		CC	48% (17,6%)	3	

Tabla 44. Análisis estratificado de la supervivencia global en el estudio del polimorfismo VEGF + 936 C/T. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

ALELOS DEL POLIMORFISMO VEGF +936 C/T

1. Alelo T del polimorfismo VEGF+936 C/T

Hemos realizado un análisis estratificado de la SG entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y el alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T (tabla 45).

En el análisis estratificado de la SG respecto a la sexo observamos que en los hombres la SG a los 85 meses es del 60% en los portadores del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T y en los no portadores ($p=0,28$). En las mujeres observamos que las portadoras del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T tienen una SG del 74% y del 63% las que no portadoras ($p=0,16$).

Respecto a la edad ,el análisis estratificado de la SG nos muestra en el grupo de pacientes mayores de 70 años una SG a los 85 meses del 63% en aquellos pacientes en los que está presente el alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T y del 56% en aquellos que no lo tienen ($p=0,25$). En el caso de pacientes con 70 años o menores: los portadores del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T muestran una SG del 69% y del 66% los no portadores del alelo ($p=0,33$).

No observamos diferencias estadísticamente significativas al realizar el análisis estratificado de la SG respecto al estadio de Dukes. En los pacientes con tumores en estadio A o B portadores del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T observamos una SG del 86% y del 87% en aquellos que no tienen este alelo ($p= 0,90$). En los pacientes en estadio C la SG es del 48% en el caso de pacientes portadores del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T y en los no portadores la SG es del 65% ($p= 0,27$). En el

estadio D los portadores del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T tienen una SG del 0% y los no portadores muestran una SG del 9% ($p=0,85$).

Respecto a la localización tumoral, observamos una SG a los 85 meses en los tumores del colon del 64% en los pacientes con el alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T y del 58% en ausencia del alelo ($p=0,41$). En los tumores del recto los pacientes portadores de este alelo muestran una SG a los 85 meses del 69% y en los no portadores del 66% ($p=0,20$).

Respecto al análisis estratificado de la SG y la histología: el grupo de los adenocarcinomas muestra una SG a los 85 meses del 66% para los pacientes que portan el alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T y del 63% en los no portadores ($p=0,24$). En los tumores mucinosos la SG es del 63% en los portadores de este alelo y del 30% en ausencia del alelo ($p=0,18$).

Así mismo no observamos diferencias estadísticamente significativas en el análisis estratificado de la SG respecto al grado de diferenciación. Este análisis nos muestra en los pacientes con grado I portadores del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T una SG a los 85 meses del 67% y en los no portadores del 65% ($p=0,31$). En los pacientes con grado de diferenciación II portadores del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T observamos una SG del 64% y del 54% en los no portadores ($p=0,86$). En el caso de pacientes con tumores en grado III la SG es del 50% en los portadores del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T y del 48% en los no portadores ($p=0,33$).

Variable	Categorías	Alelo T	SG (EE) (85meses)	n	p
Sexo	Hombres	T	60% (7,5%)	18	0,28
		no T	60% (4,6%)	43	
	Mujeres	T	74% (8,5%)	14	0,16
		no T	63% (4,6%)	42	
Edad	> 70	T	63% (8,2%)	11	0,25
		no T	56% (4,8%)	30	
	≤ 70	T	69% (7,9%)	21	0,33
		no T	66% (4,4%)	55	
Dukes	A+B	T	86% (5,4%)	24	0,90
		no T	87% (3,2%)	62	
	C	T	48% (11,0%)	8	0,27
		no T	65% (6,7%)	24	
	D	T	0% (0,0%)	0	0,85
		no T	9% (3,8%)	5	
Localización	Colon	T	64% (7,5%)	17	0,41
		no T	58% (4,4%)	44	
	Recto	T	69% (8,7%)	15	0,20
		no T	66% (4,9%)	41	
Histología	Adenocarcinoma	T	66% (6,1%)	27	0,24
		no T	63% (3,3%)	83	
	Mucinoso	T	63% (17,1%)	5	0,18
		no T	30% (12,5%)	2	
Grado de diferenciación	I	T	67% (6,7%)	22	0,31
		no T	65% (4,0%)	73	
	II	T	64% (16,9%)	4	0,86
		no T	54% (7,1%)	12	
	III	T	50% (35,4%)	2	0,33
		no T	48% (17,6%)	3	

Tabla 45. Análisis estratificado de la supervivencia global en relación con el alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

2. Alelo C del polimorfismo VEGF+936 C/T

Se ha estudiado la SG de los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y la presencia o ausencia del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T (tabla 46).

En relación al sexo de los pacientes, se observó que los hombres portadores del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T tienen SG del 60% y la de los no portadores del 100% ($p=0,48$). En las mujeres portadoras del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T la SG a los 85 meses es del 65% y la de las no portadoras del 67% ($p=0,42$).

Con respecto a la edad de los pacientes, en el grupo de pacientes de edad mayor a 70 años la SG a los 85 meses es del 57% en los portadores del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T y del 100% en los no portadores ($p=0,15$). En el caso de de pacientes de 70 años o menores la SG de los portadores del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T es del 67% y de 0% para los que no presentan este alelo ($p=0,63$).

En el análisis estratificado del estadio de Dukes, aquellos pacientes con tumores en estadio A o B muestran una SG a los 85 meses del 87% en los pacientes que tenían el alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T mientras que en aquellos que no presentaban este alelo la SG es del 100% ($p=0,51$). En el grupo de pacientes con tumores en estadio C la SG a los 85 meses fue del 61% en el caso de los portadores del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T y del 50% en aquellos que no presentaban dicho alelo ($p=0,74$). En los tumores en estadio D observamos una SG del 8% para los pacientes portadores del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T.

Al estratificar según localización tumoral se observó que los pacientes con los tumores localizados en el colon tienen una SG a los 85 meses del 59% cuando son portadores del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T y del 100% en los no

portadores ($p=0,32$). En el grupo de pacientes con tumores localizados en recto la SG es del 67% para todos los pacientes (aquellos que presentan el alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T y aquellos que no lo portan ($p=0,63$)).

Respecto al análisis estratificado del tipo histológico observamos que en adenocarcinomas la SG a los 85 meses en los pacientes que tienen el alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T es del 64% y del 67% para los que no lo presentaban ($p=0,34$). En el caso de los tumores mucinosos los portadores de dicho alelo muestran una SG del 40% y los no portadores del 100% ($p=0,36$).

Como en los anteriores casos no observamos diferencias estadísticamente significativas al estudiar el grado de diferenciación, en el grupo de tumores de grado I la SG de los portadores del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T es del 65% y del 75% en el caso de los no portadores ($p=0,30$). En el caso de los tumores de grado II la SG es del 56% para los pacientes portadores del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T. En los tumores de grado III se observa una SG del 47% para los pacientes que tienen alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T.

Variable	Categorías	Alelo C	SG (EE) (85meses)	n	p
Sexo	Hombres	C	60% (3,9%)	60	0,48
		no C	100% (---)	1	
	Mujeres	C	65% (4,1%)	54	0,42
		no C	67% (27,2%)	2	
Edad	> 70	C	57% (4,2%)	38	0,15
		no C	100% (---)	4	
	≤ 70	C	67% (3,8%)	76	0,63
		no C	0% (0,0%)	0	
Dukes	A+B	C	87% (2,8%)	83	0,51
		no C	100% (---)	3	
	C	C	61% (3,8%)	26	0,74
		no C	50% (3,5%)	1	
	D	C	8% (3,4%)	5	---
		no C	---		
Localización	Colon	C	59% (3,8%)	60	0,32
		no C	100% (---)	2	
	Recto	C	67% (4,3%)	54	0,63
		no C	67% (2,7%)	2	
Histología	Adenocarcinoma	C	64% (2,9%)	108	0,34
		no C	67% (27,2%)	2	
	Mucinoso	C	40% (10,4%)	6	0,36
		no C	100% (---)	1	
Grado de diferenciación	I	C	65% (3,5%)	82	0,30
		no C	75% (2,7%)	3	
	II	C	56% (6,5%)	16	---
		no C	---		
	III	C	47% (15,9%)	4	---
		no C	---		

Tabla 46. Análisis estratificado de la supervivencia global en relación con el alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

E.4. Análisis estratificado de la supervivencia global entre los factores pronóstico y delección en la región 9A del gen EphB2.

Hemos estudiado la SG de los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y la presencia de delección o no en la región 9A del gen EphB2 (tabla 47).

De nuestro estudio concluimos que la presencia de delección en dicha región confiere mejor supervivencia a los pacientes con adenocarcinoma colorrectal. La SG a los 85 meses es del 100% en los adenocarcinomas que han sufrido delección en la región 9A del gen EphB2 ($p=0,047$). Estos pacientes tienen un 95% de reducción relativa de la tasa de mortalidad frente a los pacientes sin esta alteración génica ($HR=0,048$; $IC95\%=0,00-23,42$; $p=0,047$) (figura 18).

Variable	Categorías	Delección	SG (EE) (85meses)	n	HR*	IC 95 %	p
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Deleccionado	100% (---)	8	0,048	0,00-23,42	0,047
		No deleccionado	65% (3,0%)	107			
	Mucoide	Deleccionado	0% (0,0%)	0	2,18	0,47-1,12	0,37
		No deleccionado	48% (10,5%)	9			

Tabla 47. Análisis estratificado de la supervivencia global en el estudio de delección en la región 9A del gen EphB2. Serie de 323 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

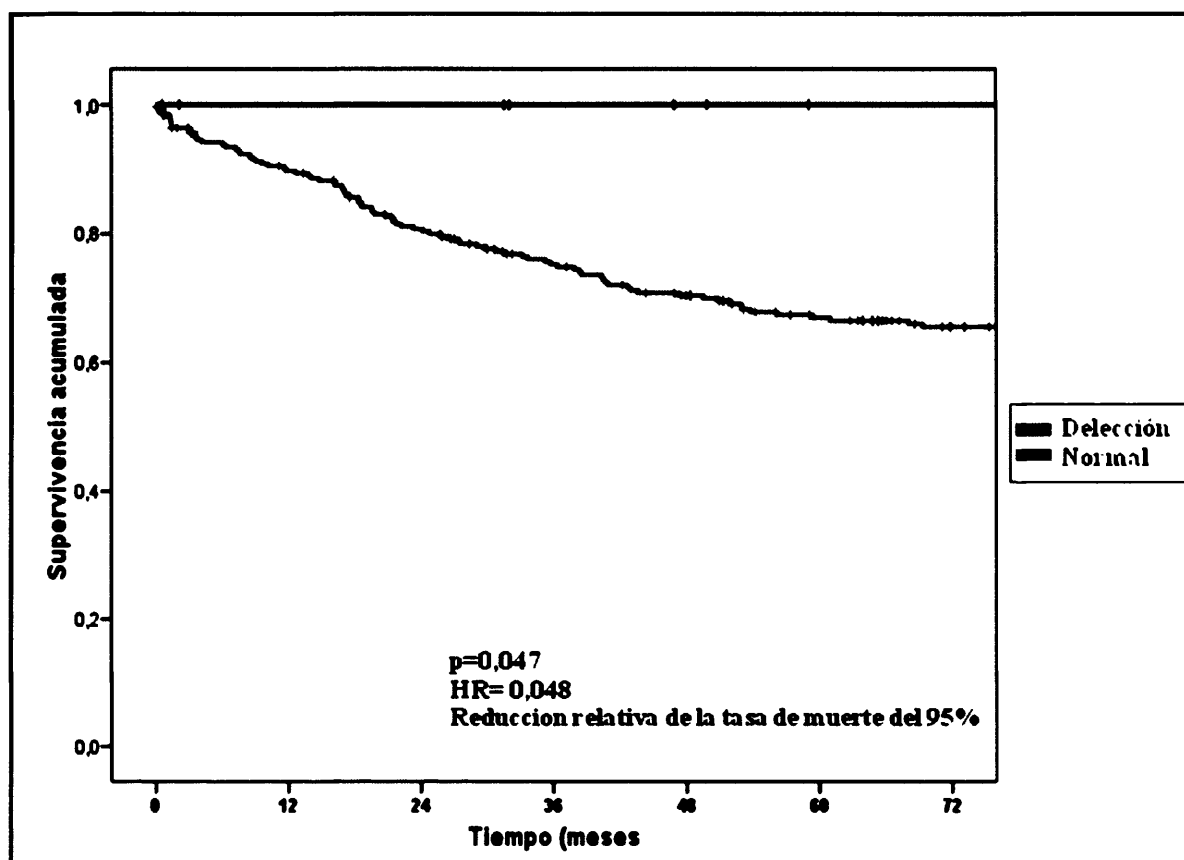


Figura 18. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con adenocarcinoma colorrectal según presencia de delección en la región 9A del gen EphB2. Serie de 323 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995- Noviembre 2009)

VII.F. Análisis multivariante de la supervivencia global

No hemos encontrado con el tamaño muestral de este estudio y con las variables estudiadas que alguna de ellas se comporte como un factor pronóstico.

Sin embargo el adenocarcinoma parece ser un factor de buen pronóstico ajustado por estadio ($p < 0,001$; HR indeterminado; IC95%=---

VIII. EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA COLORRECTAL ESPORÁDICO. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD.

VIII.A. Estudio de la supervivencia libre de enfermedad

Consideramos la SLE como el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la fecha del diagnóstico de la primera recurrencia.

Aquellos pacientes que presentaban metástasis irresecables en el diagnóstico fueron tratados con cirugía paliativa. Por este motivo fueron excluidos del estudio de SLE 60 pacientes (17,4%). Además hubo un paciente en el que no pudimos determinar su evolución.

77 pacientes (22,3%) sufrieron una recidiva del tumor. La recidiva fue locorregional en 16 pacientes y en 61 a distancia.

La SLE a los 85 meses es de los pacientes es del 70% (figura 19).

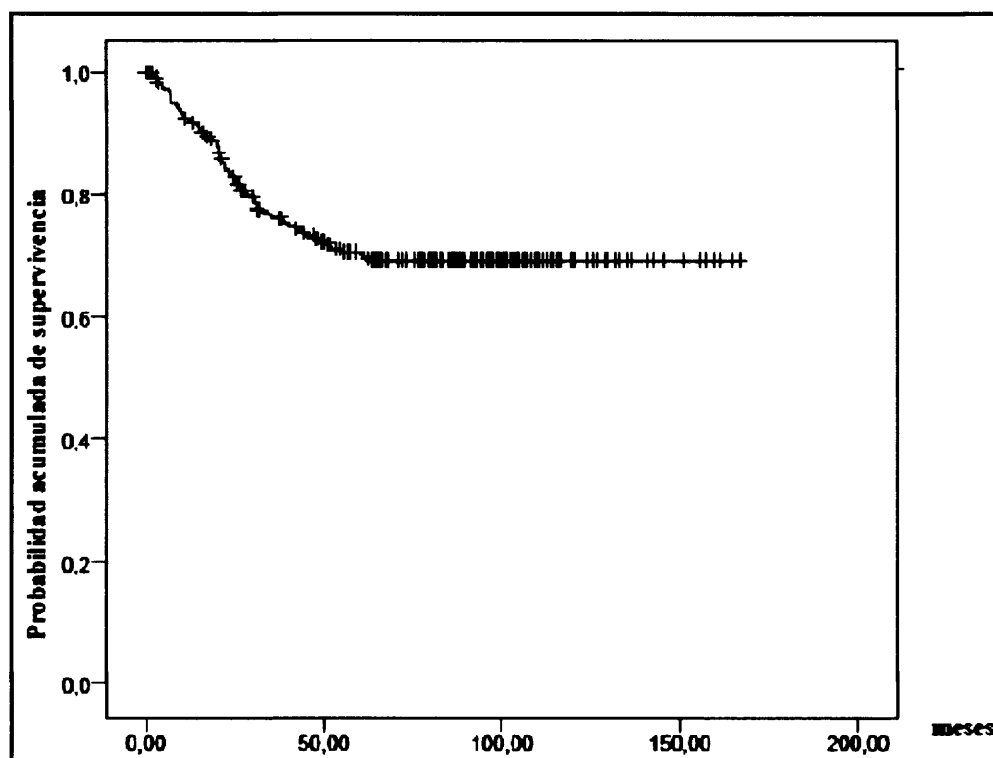


Figura 19. Curva de supervivencia libre de enfermedad acumulada de los pacientes con cáncer colorrectal. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

VIII.B. Análisis univariante de la probabilidad acumulada de recidivar en los pacientes con CCR en relación con las variables clínico-patológicas y con los factores pronóstico clásicos

Hemos investigado la relación de los factores pronóstico clásicos y las variables clínico-patológicas con la SLE de los pacientes con CCR. Además hemos analizado el riesgo de recidivar que presentan (tabla 48)

Ninguna variable clínico patológica estudiada muestra una relación significativa con la SLE.

El estadio de Dukes es el único factor pronóstico clásico de todos los que analizamos que mostró una significación pronóstica respecto al riesgo de recidivar. El estadio C tiene una tasa de recidiva 3,27 veces mayor que la de los pacientes en estadio A o B. La tasa de recidiva de los pacientes en estadio D es 7,81 veces mayor que la de los pacientes en estadios A o B ($p<0,001$) (figura 20)

Variable	Categorías	SLE (EE) (85meses)	n	HR	IC 95%	p
Sexo	Hombres	68% (4,1%)	55	1,173	0,75-1,83	0,34
	Mujeres	70% (4,1%)	53			
Edad	> 70	68% (4,2%)	41	1,11	0,71-1,73	0,56
	≤ 70	70% (4,1%)	67			
Estadio	A+B	82% (3,1%)	76	3,27	2,01-5,33	<0,001
	C	53% (5,7%)	25			
	D	18% (10,5%)	2			
Grado	I	71% (3,5%)	81	1,04	0,57-1,92	0,08
	II	71% (6,8%)	15			
	III	58% (14,2%)	3			
Localización del tumor	Proximal	74% (5,4%)	24	0,97	0,54-1,75	0,24
	Distal	61% (5,6%)	31			
	Recto	73% (4,3%)	53			
Tipo histológico	Adenocarcinoma	71% (0,03%)	102	0,56	0,28-1,13	0,17
	Mucoide	51% (11,7%)	6			

Tabla 48. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con las variables clínico-patológicas y factores pronóstico clásicos de los pacientes con CCR. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995- Noviembre 2009).

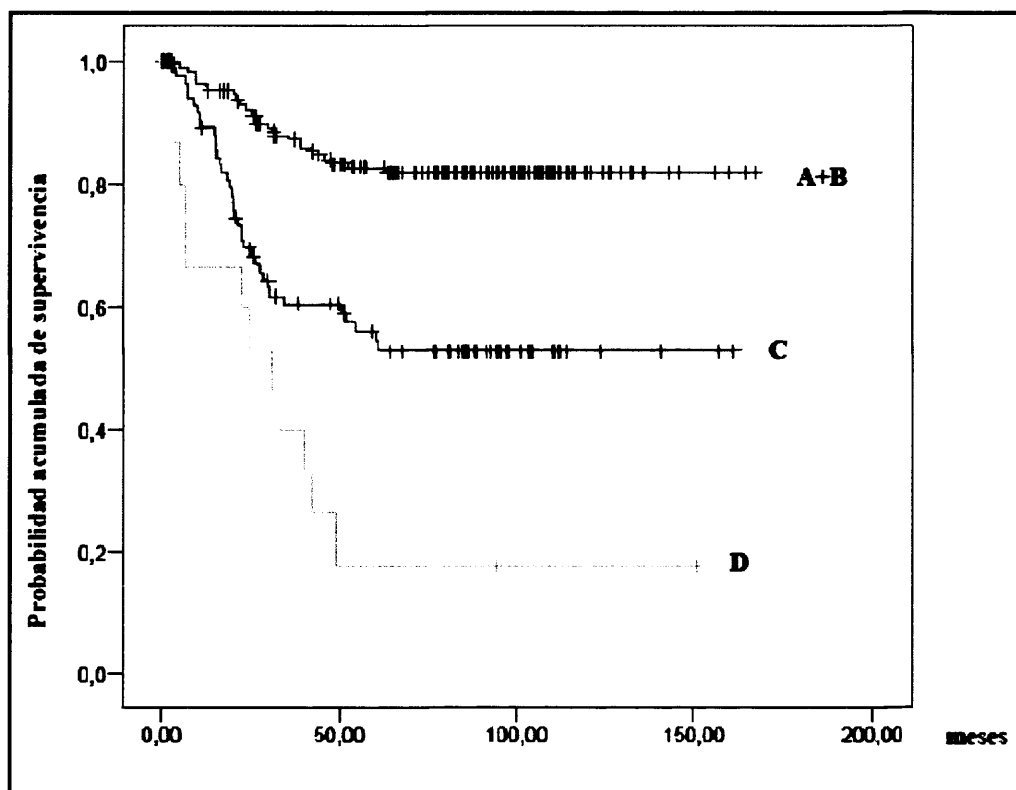


Figura 20. Curva de supervivencia libre de enfermedad acumulada de los pacientes con cáncer colorrectal según el estadio tumoral. Serie de 345 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

VIII.C. Análisis univariante de la probabilidad acumulada de recidivar en los pacientes con CCR en relación con los polimorfismos del gen VEGF

C.1. Polimorfismo VEGF -2578 C/A

Al estudiar si el polimorfismo VEGF -2578 C/A muestra una asociación significativa con la SLE en los pacientes con CCR observamos que no existe ($p=0,60$)

La SLE de los pacientes con genotipo A/A es de 76%, es de 68% para los del genotipo A/C y de 67 % para los del genotipo C/C. (Tabla 49)

Polimorfismo	Genotipo	SLE (EE) (85meses)	n	HR	IC 95%	p
VEGF -2578 C/A	A/A	76% (5,7%)	24			0,60
	A/C	68% (4,2%)	52	1,31	0,72-2,41	
	C/C	67% (5,8%)	31	1,42	0,72-2,77	

Tabla 49. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el polimorfismo VEGF -2578 C/A de los pacientes con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

ALELOS DEL POLIMORFISMO VEGF -2578 /A

Investigamos si el alelo C del polimorfismo VEGF -2578 C/A es un factor pronóstico de SLE en los pacientes con CCR. La SLE para los portadores del alelo C es de 68% y del 76% para los no portadores. No hay diferencias significativas entre ambas SLE ($p=0,41$) (Tabla 50)

Polimorfismo	Alelo	SLE (85meses)	n	HR	IC 95%	p
VEGF -2578 C/A	C	68% (3,4%)	83	1,35	0,75-2,40	0,41
	no C	76% (5,7%)	24			

Tabla 50. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el alelo C del polimorfismo VEGF -2578 C/A de los pacientes con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

Tampoco observamos una relación significativa entre la SLE de los portadores del alelo A ($p=0,41$). La SLE es del 70% para los portadores y del 67% para los no portadores. (Tabla 51)

Polimorfismo	Alelo	SLE (EE) (85meses)	n	HR	IC 95%	p
VEGF -2578 C/A	A	70%(3,4%)	76	0,86	0,52-1,41	0,41
	no A	67% (5,8%)	31			

Tabla 51. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el alelo A del polimorfismo VEGF -2578 C/A de los pacientes con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

C.2. Polimorfismo VEGF -1154 G/A

Analizamos si el polimorfismo VEGF -1154 G/A presentaba valor pronóstico en la SLE de los pacientes con CCR.

Los homocigotos mutados presentan una SLE del 75%, la de los heterocigotos es de 68% y la de los homocigotos normales del 69%. Este polimorfismo no presenta un valor pronóstico en la SLE ($p=0,87$) (tabla 52)

Polimorfismo	Genotipo	SLE (EE) (85meses)	n	HR	IC 95%	p
VEGF -1154 G/A	A/A	75% (5,8%)	21	0,81	0,43-1,51	0,87
	G/A	68% (4,9%)	36	1,02	0,62-1,67	
	G/G	69% (4,6%)	50			

Tabla 52. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el polimorfismo VEGF -1154 G/A de los pacientes con CCR. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

ALELOS DEL POLIMORFISMO VEGF -1154 G/A

Al estudiar los alelos del polimorfismo -1154 G/A respecto a la SLE observamos que no son factores pronóstico de la SLE.

El alelo G tiene un incremento de la tasa de recidiva de 1,25 veces respecto al no G. El alelo A tiene una reducción de la tasa de recidiva del 7% frente al alelo no A. (Tablas 53 y 54)

Polimorfismo	Alelo	SLE (EE) (85meses)	n	HR	IC 95%	p
VEGF -1154 G/A	G	68% (3,4%)	86	1,25	0,70-2,24	0,61
	no G	75% (5,8%)	21			

Tabla 53. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A de los pacientes con CCR. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

Polimorfismo	Alelo	SLE (EE) (85meses)	n	HR	IC 95 %	p
VEGF -1154 G/A	A	71% (3,8%)	57	0,93	0,59-1,47	0,77
	no A	69% (4,6%)	50			

Tabla 54. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A de los pacientes con CCR. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

C.3. Polimorfismo VEGF +936 C/T

Investigamos si los distintos genotipos de polimorfismo VEGF +936 C/T presentan diferencias significativas en el riesgo de recaer de estos pacientes.

El genotipo TT muestra una SLE de 80%, el C/T de 61% y el C/C de 70%. No muestran diferencias significativas en el riesgo de recidiva ($p=0,51$). (Tabla 55)

Polimorfismo	Genotipo	SLE (EE) (85meses)	n	HR	IC 95%	p
VEGF +936 C/T	T/T	80% (17,9%)	3	0,57	0,08-4,13	0,51
	C/T	61% (6,0%)	28	1,19	0,72-1,97	
	C/C	70% (3,4%)	76			

Tabla 55. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el polimorfismo VEGF +936 C/T de los pacientes con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

ALELOS DEL POLIMORFISMO VEGF +936 C/T

Los alelos del polimorfismo VEGF +936 C/T no tienen un valor pronóstico de riesgo de recaer ($p=0,41$ para el alelo C y $p=0,56$ para el alelo T) (Tablas 56 y 57)

La HR para el alelo C es 1,83 veces mayor que para el alelo no C. La HR para el alelo T es 1,14 veces mayor que para el alelo no T

Polimorfismo	Alelo	SLE (EE) (85meses)	n	HR	IC 95%	p
VEGF +936 C/T	C	69% (3,0%)	104	1,83	0,26-13,18	0,41
	no C	80% (17,9%)	3			

Tabla 56. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T de los pacientes con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

Polimorfismo	Alelo	SLE (EE) (85 meses)	n	HR	IC 95%	p
VEGF +936 C/T	T	67% (5,7%)	31	1,14	0,69-1,86	0,56
	no T	70% (3,4%)	76			

Tabla 57. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T de los pacientes con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

VIII.D. Análisis univariante de la probabilidad acumulada de recidivar en los pacientes con CCR en relación con delección en la región 9A del gen EphB2

El análisis de la relación entre la SLE y delección en la región 9A del gen EphB2 en los pacientes con CCR nos muestra que no hay diferencias significativas ($p=0,75$) (tabla 58).

Variable	Categorías	SLE (EE) (85 meses)	n	HR	IC 95%	p
Delección	No deleccionado	70% (18,2%)	0	0,90	0,22-3,68	0,75
	Deleccionado	71% (3%)	105			

Tabla 58. Análisis univariante de la supervivencia libre de enfermedad en relación con presencia de delección en la región 9A del gen EphB2. Serie de 323 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

La SLE de los pacientes con delección es de 70% y del 71% en el grupo de pacientes que no la tienen (figura 21).

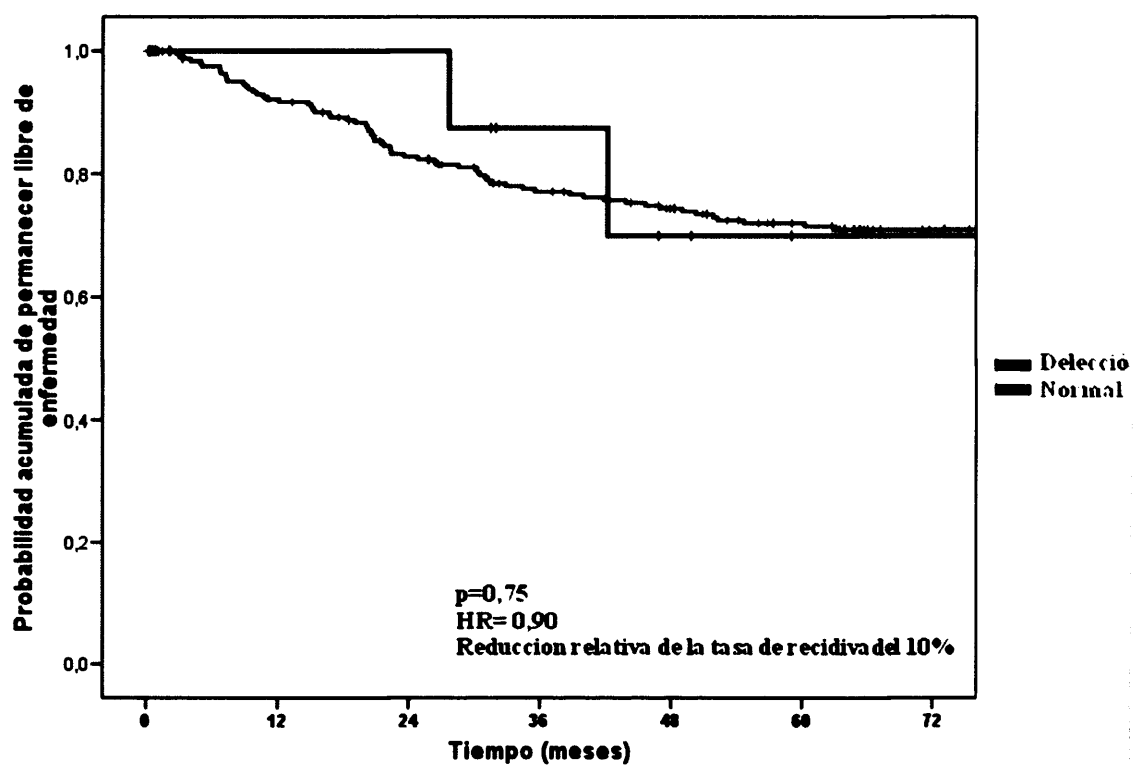


Figura 21. Curva de supervivencia libre de enfermedad acumulada de los pacientes con cáncer colorrectal según la presencia de delección en la región 9A del gen EphB2. Serie de 323 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995- Noviembre 2009)

VIII.E. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad

E.1. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre los factores pronóstico y el polimorfismo VEGF -2578 C/A.

El análisis estratificado de la SLE de los pacientes con CCR entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y el polimorfismo VEGF -2578 C/A se resume en la tabla 59.

Cuando estratificamos por el sexo de los pacientes, se observa que en los hombres homocigotos mutados la SLE era del 84%, del 64% en los heterocigotos y del 60% en homocigotos “silvestre” ($p=0,08$). En las mujeres la SLE es del 69% en homocigotas AA y en la heterocigotas AC y del 77% en las homocigotas CC ($p=0,56$).

Respecto a la edad, en los pacientes mayores de 70 años observamos una SLE del 69% en los homocigotos AA y del 68% en los heterocigotos AC mientras que los homocigotos CC muestran una SLE del 67% ($p=0,88$). En el caso de pacientes con 70 años de edad o menores, la SLE es del 86% en los homocigotos mutados y del 67% tanto en los heterocigotos como en los homocigotos “silvestre” ($p=0,19$).

Con respecto a la estratificación según el estadio de Dukes: el grupo de los pacientes con tumores en estadio A o B presentaron una SLE del 87% los homocigotos para la alteración genética, del 83% en los heterocigotos y del 76% en los homocigotos “silvestre” ($p=0,67$). La SLE de los pacientes con tumores en estadio C es del 53% en los homocigotos AA, del 45% en los heterocigotos AC y del 64% homocigotos CC ($p=0,97$). En el caso de los tumores en estadio D hay que destacar que los homocigotos AA tienen una mayor SLE (33%) que heterocigotos AC (SLE del 25%) y que la SLE de los homocigotos CC (0%), ($p=0,02$).

En relación a la estratificación por la localización del tumor, observamos que en el cáncer de colon la SLE es del 68% para los pacientes homocigotos mutados y del 67% tanto en los heterocigotos como en los homocigotos “silvestre” ($p=0,96$). En el grupo de los pacientes con tumores de recto, la SLE es del 85% en los pacientes homocigotos AA, del 69% en los heterocigotos AC y del 68% en los homocigotos CC ($p=0,34$).

Con respecto a la estratificación por el tipo histológico: en los adenocarcinomas la SLE es del 75% en los pacientes de genotipo AA, del 70% en los de genotipo AC y del 69% en los de genotipo CC ($p=0,71$). En los pacientes con tumores de tipo histológico mucinoso la SLE de los homocigotos mutados es del 100%, en los heterocigotos es del 40% y del 54% en los homocigotos “silvestre” ($p=0,66$).

En el análisis estratificado según el grado de diferenciación, observamos que los pacientes con tumores grado I tienen una SLE del 80% en los homocigotos AA, del 68% en los heterocigotos AC y en los homocigotos CC ($p=0,49$). El grupo de los pacientes con tumores grado II muestra una SLE del 58% en aquellos que tienen genotipo AA, del 76% en los pacientes con genotipo AC y del 80% en los de genotipo CC ($p=0,44$). En los pacientes con tumores grado III la SLE en los homocigotos mutados y en los “silvestre” es del 50% y del 75% en los heterocigotos ($p=0,47$).

Variable	Categorías	VEGF -2578 C/A	SLE (EE) (85meses)	n	p
Sexo	Hombres	AA	84% (7,3%)	11	0,08
		AC	64% (5,9%)	29	
		CC	60% (8,1%)	14	
	Mujeres	AA	69% (8,3%)	13	0,56
		AC	69% (6,0%)	23	
		CC	77% (7,8%)	17	

Edad	> 70	AA	69% (7,8%)	10	0,88
		AC	68% (6,2%)	18	
		CC	67% (8,2%)	13	
	≤ 70	AA	86% (7,4%)	14	0,19
		AC	67% (5,7%)	34	
		CC	67% (8,1%)	18	
Dukes	A+B	AA	87% (5,3%)	19	0,67
		AC	83% (4,2%)	43	
		CC	76% (6,9%)	19	
	C	AA	53% (13,3%)	5	0,97
		AC	45% (8,2%)	7	
		CC	64% (9,6%)	12	
	D	AA	33% (27,2%)	0	0,02
		AC	25% (15,3%)	2	
		CC	0% (0,0%)	0	
Localización	Colon	AA	68% (8,5%)	11	0,96
		AC	67% (5,8%)	26	
		CC	67% (7,4%)	18	
	Recto	AA	85% (7,0%)	13	0,34
		AC	69% (6,1%)	26	
		CC	68% (9,4%)	13	
Histología	Adenocarcinoma	AA	75% (5,8%)	24	0,71
		AC	70% (4,3%)	48	
		CC	69% (6,0%)	30	
	Mucinoso	AA	100% (---)	2	0,66
		AC	40% (15,5%)	4	
		CC	54% (20,1%)	1	
Grado de diferenciación	I	AA	80% (6,5%)	18	0,49
		AC	68% (5,1%)	37	
		CC	68% (6,8%)	25	
	II	AA	58% (16,1%)	4	0,44
		AC	76% (8,7%)	8	
		CC	80% (12,6%)	3	
	III	AA	50% (21,7%)	0	0,47
		AC	75% (21,7%)	1	
		CC	50% (25,0%)	1	

Tabla 59. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en el estudio del polimorfismo VEGF -2578 C/A. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

ALELOS DEL POLIMORFISMO VEGF-2578 C/A

1. Alelo A del polimorfismo VEGF-2578 C/A

Hemos realizado un análisis estratificado de la SLE entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y la presencia o ausencia del alelo A del polimorfismo VEGF -2578 C/A (tabla 60).

En el análisis estratificado de la SLE respecto al sexo hay que destacar que los hombres portadores del alelo A VEGF-2578 C/A muestran una mayor SLE (71%) que los no portadores (60%) ($p=0,04$). En las mujeres observamos que las portadoras del alelo A VEGF-2578 C/A tienen una SLE del 69% y en las que no tienen este alelo es del 77% ($p=0,29$).

El análisis estratificado de la SLE respecto a la edad, el análisis estratificado de la SLE nos muestra en los pacientes mayores de 70 años una SLE del 69% en los portadores del alelo A VEGF -2578 C/A y del 67% en los no portadores ($p=0,86$). En los menores de 70 años o de esa edad portadores del alelo A VEGF-2578 C/A observamos una SLE del 71% y del 67% en los no portadores del alelo ($p=0,35$).

Respecto al estadio de Dukes: aquellos pacientes en estadio A o B portadores del alelo A VEGF -2578 C/A muestran una SLE del 84% y del 77% en aquellos que no tienen este alelo ($p= 0,47$). En los tumores en estadio C la SLE es del 47% para los que tienen el alelo A VEGF -2578 C/A y del 64% para los que no lo tienen ($p= 0,81$). En el grupo de pacientes en estadio D tenemos que destacar que los no portadores del alelo A VEGF -2578 C/A tienen una SLE del 0% y en los portadores es del 24% ($p= 0,01$).

Respecto a la localización tumoral: la SLE en los tumores del colon es del 67% tanto en los portadores del alelo A VEGF -2578 C/A como en los no portadores ($p=$

0,78). En los tumores localizados en el recto: en los pacientes portadores de este alelo observamos una SLE del 74% y del 68% para los no portadores ($p=0,32$).

Tampoco hemos observado diferencias estadísticamente significativas en el análisis estratificado de la SLE y la histología. La SLE en el grupo de los adenocarcinomas es del 72% en los portadores del alelo A VEGF -2578 A/C y del 69% en los no portadores ($p=0,44$). En los tumores mucinosos la SLE es del 46% en los portadores de este alelo y del 54% en los pacientes sin el alelo A VEGF -2578 C/A ($p=0,88$).

En cuanto al análisis estratificado de la SLE y el grado de diferenciación observamos que los pacientes con grado I y portadores del alelo A VEGF-2578 C/A la SLE es del 72% y del 68% en los que este alelo está ausente ($p=0,57$). En el caso de los tumores de grado de diferenciación II: los no portadores del alelo A VEGF-2578 C/A muestran una SLE del 71% y del 80% en los portadores ($p=0,76$). En el grupo de pacientes con tumores en grado III la SLE es del 63% en los portadores del alelo A VEGF-2578 C/A y del 50% en los no portadores ($p=0,31$).



Variable	Categorías	Alelo A	SLE (EE) (85meses)	n	p
Sexo	Hombres	A	71% (4,8%)	40	0,04
		no A	60% (8,1%)	16	
	Mujeres	A	69% (4,9%)	36	0,29
		no A	77% (7,8%)	17	
Edad	> 70	A	69% (4,9%)	28	0,86
		no A	67% (8,2%)	13	
	≤ 70	A	71% (4,8%)	48	0,35
		no A	67% (8,1%)	18	
Dukes	A+B	A	84% (3,3%)	62	0,47
		no A	77% (6,9%)	19	
	C	A	47% (7,0%)	12	0,81
		no A	64% (9,6%)	11	
	D	A	24% (13,8%)	2	0,01
		no A	0% (0%)	0	
Localización	Colon	A	67% (4,8%)	36	0,78
		no A	67% (7,4%)	18	
	Recto	A	74% (74,8%)	39	0,32
		no A	68% (9,4%)	13	
Histología	Adenocarcinoma	A	72% (3,4%)	72	0,44
		no A	69% (6,0%)	30	
	Mucinoso	A	46% (15,0%)	4	0,88
		no A	54% (20,1%)	1	
Grado de diferenciación	I	A	72% (4,1%)	55	0,57
		no A	68% (6,8%)	25	
	II	A	71% (7,8%)	12	0,76
		no A	80% (12,6%)	3	
	III	A	63% (17,1%)	2	0,31
		no A	50% (25,0%)	1	

Tabla 60. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el alelo A del polimorfismo VEGF -2578 C/A de los pacientes con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

2. Alelo C del polimorfismo VEGF-2578 C/A

El análisis estratificado de la SLE entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y el alelo C del polimorfismo VEGF -2578 C/A se resume en la tabla 61.

El análisis estratificado de la SLE respecto al sexo nos muestra que en los hombres la SLE es del 64% en los portadores del alelo C VEGF -2578 C/A y del 84% en los no portadores ($p=0,12$). En las mujeres observamos que las portadoras del alelo C VEGF -2578 C/A tienen una SLE del 71% y del 69% en las que este alelo está ausente ($p=0,56$).

En cuanto a la edad el análisis estratificado de la SLE nos muestra en el grupo de pacientes mayores de 70 años una SLE del 68% en los que el alelo C VEGF -2578 C/A está presente y del 69% en los que está ausente ($p=0,70$). En los menores de 70 años o con esa edad portadores del alelo C VEGF-2578 C/A observamos una SLE del 67% y del 86% en los no portadores del alelo ($p=0,07$).

Respecto al análisis estratificado de la SLE y el estadio de Dukes en los pacientes portadores del alelo C VEGF-2578 C/A en estadio A+B observamos una SLE del 81% y del 87% en los que no tienen dicho alelo ($p= 0,46$). En el grupo de los tumores en estadio C la SLE es del 52% para los que tienen el alelo C VEGF -2578 C/A y del 53% en los no portadores ($p= 0,88$). En los pacientes de estadio D los portadores del alelo C VEGF -2578 C/A tienen una SLE del 17% y del 33% en los no portadores ($p= 0,73$).

No observamos diferencias estadísticamente significativas al realizar el análisis estratificado de la SLE respecto a la localización tumoral. En los tumores localizados

en el colon observamos una SLE del 67% en los pacientes que tienen el alelo C VEGF -2578 C/A y del 68% para los no tienen dicho alelo ($p= 1,00$). En los tumores del recto los pacientes portadores de este alelo muestran una SLE del 69% y del 85% para los no portadores ($p= 0,19$).

Al estratificar según la histología el análisis estratificado de la SLE nos muestra que el grupo de los adenocarcinomas tienen una SLE del 70% en los pacientes que tienen el alelo C VEGF -2578 A/C y del 75% en los está ausente dicho alelo ($p= 0,61$). En los tumores mucinosos la SLE es del 45% en los portadores de dicho alelo y del 100% en los no portadores ($p= 0,40$).

Tampoco observamos que el alelo C del polimorfismo VEGF-2578 C/A estableciese diferencias en la SLE al estratificar según el grado de diferenciación, el análisis estratificado de la SLE nos muestra en los pacientes con grado I portadores del alelo C del polimorfismo VEGF -2578 C/A una SLE del 68% y del 80% en los no portadores ($p= 0,23$). En el grupo de tumores con grado de diferenciación II portadores del alelo C VEGF-2578 C/A observamos una SLE del 77% y del 58% en los no portadores ($p= 0,20$). En el grupo de pacientes con tumores en grado III la SLE es del 62% en los portadores del alelo C VEGF-2578 C/A y del 50% en los no portadores ($p= 0,85$).

Variable	Categorías	Alelo C	SLE (EE) (85meses)	n	p
Sexo	Hombres	C	64% (4,8%)	43	0,12
		no C	84% (7,3%)	11	
	Mujeres	C	71% (4,8%)	40	0,56
		no C	69% (8,3%)	13	
Edad	> 70	C	68% (5,0%)	31	0,70
		no C	69% (7,8%)	10	
	≤ 70	C	67% (4,7%)	52	0,07
		no C	86% (7,4%)	14	
Dukes	A+B	C	81% (3,6%)	62	0,46
		no C	87% (5,3%)	19	
	C	C	52% (6,4%)	19	0,88
		no C	53% (13,3%)	5	
	D	C	17% (10,8%)	2	0,73
		no C	33% (27,2%)	1	
Localización	Colon	C	67% (4,5%)	44	1,00
		no C	68% (8,5%)	17	
	Recto	C	69% (5,1%)	31	0,19
		no C	85% (7,0%)	13	
Histología	Adenocarcinoma	C	70% (3,5%)	78	0,61
		no C	75% (5,8%)	24	
	Mucinoso	C	45% (12,4%)	5	0,40
		no C	100% (---)	0	
Grado D diferenciación	I	C	68% (4,1%)	62	0,23
		no C	80% (6,5%)	18	
	II	C	77% (7,2%)	11	0,20
		no C	58% (16,1%)	4	
	III	C	62% (17,1%)	3	0,85
		no C	50% (25,0%)	0	

Tabla 61. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el alelo C del polimorfismo VEGF -2578 C/A de los pacientes con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

E.2. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre los factores pronóstico y el polimorfismo VEGF -1154 G/A

Al estratificar según el sexo de los pacientes, observamos que en los hombres la SLE es del 81% para los homocigotos AA, del 60% para los heterocigotos AG y del 67% en los homocigotos GG ($p=0,11$). Las mujeres muestran una SLE del 67% cuando son homocigotas mutadas, del 73% cuando son heterocigotas y del 71% cuando son homocigotas “silvestre” ($p=0,20$) (tabla 62).

En relación a la edad de los pacientes, aquellos con edad mayor de 70 años la SLE es del 64% si son homocigotos AA, del 73% si son heterocigotos AG y del 68% si son homocigotos GG ($p=0,37$). Los pacientes de 70 años o menores muestran una SLE del 88% para los pacientes de genotipo AA, del 62% para los de genotipo AG y del 69% para los de genotipo GG ($p=0,09$).

Respecto al análisis estratificado del estadio de Dukes, en el grupo de tumores en estadio A o B la SLE es del 95% en los homocigotos mutados, del 78% en los heterocigotos y del 80% en los homocigotos “silvestre” ($p=0,16$). En los pacientes con tumores en estadio C la SLE es del 46% en el caso de pacientes de genotipo AA, del 50% en aquellos que presentan genotipo AG y del 58% en los que tienen genotipo GG ($p=0,67$). En los tumores en estadio D la SLE es del 0% en los homocigotos mutados, del 40% en los heterocigotos y del 14% en los homocigotos “silvestre” ($p=0,33$).

Con respecto a la localización tumoral se observó que cuando el tumor estaba localizado en el colon, los pacientes homocigotos AA muestran una SLE del 62%, del 68% los heterocigotos AG y del 70% homocigotos GG ($p=0,61$). En el grupo de los pacientes con tumores localizados en recto la SLE es del 89% para aquellos con

genotipo AA, del 67% para los de genotipo AG y del 66% para los de genotipo GG ($p=0,17$).

En el análisis estratificado del tipo histológico nos muestra que en los adenocarcinomas la SLE es del 78% en el caso de homocigotos para la alteración, del 68% para los heterocigotos y del 71% en los homocigotos “silvestre” ($p=0,77$). En los tumores mucinosos los homocigotos AA tienen una SLE del 0%, del 71% en el caso de los heterocigotos AG y del 42% en los homocigotos GG ($p=0,34$).

Tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas al estudiar el grado de diferenciación. En el caso de pacientes con tumores de grado I la SLE que muestran es del 89% en el caso de genotipo AA, del 65% en el genotipo AG y del 68% en el genotipo GG ($p=0,13$). En el grupo de tumores de grado II: la SLE es del 62% en los homocigotos para la mutación, del 75% para los heterocigotos y del 80% para los homocigotos “silvestre” ($p=0,28$). Los tumores de grado III muestran una SLE del 60% en los homocigotos AA, del 33% en los heterocigotos AG y del 75% en los homocigotos GG ($p=0,77$).

Variable	Categorías	VEGF -1154 G/A	SLE (EE) (85meses)	n	p
Sexo	Hombres	AA	81% (7,0%)	12	0,11
		AG	60% (7,8%)	17	
		GG	67% (6,4%)	26	
	Mujeres	AA	67% (9,5%)	9	0,20
		AG	73% (6,1%)	19	
		GG	71% (6,7%)	25	
Edad	> 70	AA	64% (8,9%)	6	0,37
		AG	73% (6,3%)	17	
		GG	68% (7,1%)	18	
	≤ 70	AA	88% (6,5%)	15	0,09
		AG	62% (7,6%)	19	
		GG	69% (6,2%)	32	

Dukes	A+B	AA	95% (3,5%)	16	0,16
		AG	78% (5,3%)	30	
		GG	80% (5,1%)	35	
	C	AA	46% (12,4%)	4	0,67
		AG	50% (9,7%)	5	
		GG	58% (8,7%)	14	
	D	AA	0% (0,0%)	0	0,33
		AG	40% (21,9%)	1	
		GG	14% (13,2%)	1	
Localización	Colon	AA	62% (9,2%)	10	0,61
		AG	68% (6,7%)	16	
		GG	70% (5,8%)	29	
	Recto	AA	89% (5,8%)	11	0,17
		AG	67% (7,2%)	20	
		GG	66% (7,6%)	21	
Histología	Adenocarcinoma	AA	78% (5,6%)	20	0,77
		AG	68% (5,1%)	32	
		GG	71% (4,7%)	49	
	Mucinoso	AA	0% (0,0%)	0	0,34
		AG	71% (13,2%)	4	
		GG	42% (17,3%)	1	
Grado de diferenciación	I	AA	89% (5,3%)	14	0,13
		AG	65% (6,2%)	26	
		GG	68% (5,4%)	39	
	II	AA	62% (13,5%)	4	0,28
		AG	75% (11,0%)	5	
		GG	80% (10,3%)	7	
	III	AA	60% (21,9%)	1	0,77
		AG	33% (27,2%)	0	
		GG	75% (21,7%)	2	

Tabla 62. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en el estudio del polimorfismo VEGF -1154 G/A. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

ALELOS DEL POLIMORFISMO VEGF-1154 G/A

1. Alelo A del polimorfismo VEGF-1154 G/A

Se ha estudiado la SLE de los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y la presencia o ausencia del alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A (tabla 63).

Respecto al análisis estratificado del sexo de los pacientes, observamos que los hombres portadores del alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A tienen una SLE del 70% mientras que la de los no portadores del alelo es del 67% ($p=0,36$). En las mujeres las portadoras del alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A muestran una SLE del 71% y las no portadoras del 70% ($p=0,55$).

Al estratificar según la edad de los pacientes observamos que en el grupo de pacientes mayores de 70 años la SLE es del 70% en los portadores del alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 68% en los no portadores ($p=0,99$). En el grupo de pacientes menores de 70 años o con esa edad la SLE de los pacientes que tienen el alelo A del polimorfismo VEGF -11548 G/A es del 72% y del 68% para los que tienen ausente este alelo ($p=0,66$).

Con respecto al estadio de Dukes: el grupo de pacientes con tumores en estadio A o B muestran una SLE del 85% en los pacientes portadores del alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 80% en aquellos no portadores ($p=0,69$). En el grupo de pacientes con tumores en estadio C la SLE es del 48% en el caso de tener el alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 58% en aquellos que no presentaban dicho alelo ($p=0,91$). En el grupo de tumores en estadio D observamos una SLE del 14% para los no portadores del alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 25% para los portadores ($p=0,86$).

El análisis estratificado de la localización tumoral nos muestra que en los tumores localizados en el colon, la SLE de los pacientes portadores del alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A es del 66% y del 70% en los no portadores ($p=0,54$). En el grupo de pacientes con tumores localizados en recto la SLE fue del 76% para aquellos que presentan el alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 66% para aquellos en los que está ausente ($p=0,21$).

En relación a la tipo histológico observamos que en adenocarcinomas la SLE en los pacientes que tienen el alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A es del 72% y del 71% para los que no lo presentaban ($p=0,94$). En los tumores mucinosos la SLE es del 57% para los portadores del alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 42% aquellos no portadores ($p=0,31$).

Tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas al estudiar el grado de diferenciación. En el caso de pacientes con tumores de grado I la SLE de los portadores del alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A es del 74% mientras que en los no portadores es del 68% ($p=0,53$). En los tumores de grado II la SLE es del 70% para los que presentan el alelo A del polimorfismo VEGF -1154G/A y del 80% para los pacientes en los que está ausente dicho alelo ($p=0,45$). En el caso de los tumores de grado III se observa una SLE del 50% para los pacientes que tienen el alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 75% para los que no lo tienen ($p=0,70$).

Variable	Categorías	Alelo A	SLE (85meses)	n	p
Sexo	Hombres	A	70% (5,5%)	29	0,36
		no A	67% (6,4%)	25	
	Mujeres	A	71% (5,2%)	2	0,55
		no A	70% (6,7%)	56	
Edad	> 70	A	70% (5,2%)	23	0,99
		no A	68% (7,1%)	18	
	≤ 70	A	72% (5,3%)	34	0,66
		no A	68% (6,2%)	32	
Dukes	A+B	A	85% (3,7%)	46	0,69
		no A	80% (5,1%)	35	
	C	A	48% (7,7%)	10	0,91
		no A	58% (8,7%)	14	
	D	A	25% (15,3%)	1	0,86
		no A	14% (13,2%)	1	
Localización	Colon	A	66% (5,4%)	41	0,54
		no A	70% (5,9%)	29	
	Recto	A	76% (5,1%)	31	0,21
		no A	66% (7,6%)	21	
Histología	Adenocarcinoma	A	72% (3,8%)	53	0,94
		no A	71% (4,7%)	49	
	Mucinoso	A	57% (16,6%)	4	0,31
		no A	42% (17,3%)	1	
Grado de diferenciación	I	A	74% (4,6%)	41	0,53
		no A	68% (5,4%)	39	
	II	A	70% (8,5%)	8	0,45
		no A	80% (10,3%)	7	
	III	A	50% (17,7%)	1	0,70
		no A	75% (21,7%)	2	

Tabla 63. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A de los pacientes con CCR. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

2. Alelo G del polimorfismo VEGF-1154 G/A

El análisis estratificado de la SLE de los pacientes con CCR entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y la presencia o ausencia del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A se resume en la tabla 64.

En relación a la estratificación por el sexo de los pacientes, hay que destacar que los hombres portadores del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A tienen una SLE menor que los no portadores, siendo la SLE del 64% y del 81%, respectivamente ($p=0,04$). En las mujeres la SLE es del 72% en las que llevan el alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 67% en ausencia del mismo alelo ($p=0,07$).

Cuando estratificamos por la edad, los pacientes con edad mayor de 70 años muestran una SLE del 71% en los portadores del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 64% en aquellos no portadores ($p=0,19$). En el caso del grupo de pacientes de 70 años o menores, destacamos que la SLE observada es mayor en los no portadores que en los portadores del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A, la SLE es del 88% y del 66%, respectivamente ($p=0,04$).

Con respecto a la estratificación según el estadio de Dukes, los pacientes con tumores en estadio A o B presentan una SLE del 79% en los que llevan el alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 95% en los que carecen de este alelo ($p=0,06$). La SLE de los pacientes en estadio C portadores del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A es del 54% y la de los pacientes en los que está ausente este alelo es del 46% ($p=0,38$). En los pacientes con tumores en estadio D observamos una SLE del 22% para los portadores y del 0% en los no portadores del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A ($p=0,20$).

El análisis estratificado de la SLE respecto a la localización del tumor nos muestra que el grupo de tumores localizados en el colon tienen una SLE del 69% en los portadores del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 62% para los no lo tienen ($p=0,33$). En el caso de los pacientes con tumores de recto, la SLE de los portadores del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A es del 67% y del 89% en los no portadores ($p=0,07$).

Con respecto a la estratificación por el tipo histológico observamos que en los adenocarcinomas la SLE es del 69% en los pacientes con alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 78% en los no portadores ($p=0,55$). En los tumores de tipo histológico mucinoso observamos una SLE del 55% en los portadores del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 0% en el caso de los pacientes que no tienen ese alelo ($p=0,50$).

En el análisis estratificado según el grado de diferenciación hay que destacar que los pacientes con tumores grado I muestran una SLE del 70% en los pacientes que portan el alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 89% en los no portadores ($p=0,04$). El grupo de los pacientes con tumores grado II muestra una SLE en los pacientes no portadores del alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A del 61% y en aquellos portadores del 77% ($p=0,11$). En el grupo de pacientes con tumores grado III la SLE es del 57% para aquellos portadores del alelo A del polimorfismo VEGF -1154 G/A y del 60% para los no portadores ($p=0,79$).

Variable	Categorías	Alelo G	SLE (EE) (85meses)	n	p
Sexo	Hombres	G	64% (5,0%)	42	0,04
		no G	81% (7,0%)	12	
	Mujeres	G	72% (4,6%)	43	0,07
		no G	67% (9,5%)	9	
Edad	> 70	G	71% (4,7%)	35	0,19
		no G	64% (8,9%)	6	
	≤ 70	G	66% (4,8%)	51	0,04
		no G	88% (6,5%)	14	
Dukes	A+B	G	79% (3,7%)	65	0,06
		no G	95% (3,5%)	16	
	C	G	54% (6,5%)	19	0,38
		no G	46% (12,4%)	5	
	D	G	22% (12,8%)	2	0,20
		no G	0% (0,0%)	0	
Localización	Colon	G	69%(4,4%)	45	0,33
		no G	62% (9,2%)	9	
	Recto	G	67% (5,2%)	41	0,07
		no G	89% (5,8%)	11	
Histología	Adenocarcinoma	G	69% (3,5%)	81	0,55
		no G	78% (5,6%)	21	
	Mucinoso	G	55% (12,7%)	5	0,50
		no G	0% (0,0%)	0	
Grado de diferenciación	I	G	70% (4,1%)	65	0,04
		no G	89% (5,3%)	15	
	II	G	77% (7,5%)	12	0,11
		no G	61% (13,5%)	3	
	III	G	57% (18,7%)	2	0,79
		no G	60% (21,9%)	1	

Tabla 64. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el alelo G del polimorfismo VEGF -1154 G/A de los pacientes con CCR. Serie de 341 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

E.3. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre los factores pronóstico y el polimorfismo VEGF +936 C/T

Hemos estudiado la SLE de los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y el polimorfismo VEGF +936 C/T (tabla 65).

Al estudiar el sexo observamos que la SLE de los hombres homocigotos mutados era del 100%, mientras que es del 64% en los heterocigotos y del 70% en los homocigotos “silvestre” ($p=0,76$). Respecto a las mujeres, tampoco observamos diferencias significativas en la SLE. Las homocigotas mutadas tienen una SLE del 75%, las heterocigotas del 71% y las homocigotas “silvestre” del 71% ($p=0,76$).

En el análisis estratificado respecto a la edad observamos en el grupo de pacientes con edad mayor de 70 años una SLE en los homocigotos mutados del 100%, en los heterocigotos del 63% y del 69% en los “wild tipe” ($p=0,28$). En el grupo de pacientes de 70 años o menores, la SLE es del 0 % en los homocigotos portadores de la mutación, del 70% en los heterocigotos y del 72% en los homocigotos sin la alteración genética ($p=0,76$).

Tampoco observamos diferencias significativas en el análisis estratificado respecto al estadio de Dukes. El grupo de pacientes con tumores en estadio A o B presentaron una SLE del 100% en los pacientes de genotipo TT, del 83% aquellos con genotipo TC y del 82% en los pacientes de genotipo CC ($p=0,72$). La SLE de los pacientes en estadio C fue del 50% en los homocigotos TT, del 41% en los heterocigotos TC y del 57% en los homocigotos CC ($p=0,37$). Los pacientes en estadio D muestran una SLE del 0% los heterocigotos y del 21% los homocigotos “silvestre” ($p=0,45$).

Respecto a la localización tumoral, el análisis estratificado de la SLE nos muestra en los tumores de colon una SLE del 100% en los pacientes homocigotos para la mutación, del 66% en los heterocigotos y en aquellos homocigotos “silvestre” del 67% ($p=0,60$). En los tumores de recto observamos una SLE del 67% en pacientes homocigotos TT, del 68% en los heterocigotos TC y del 75% en los homocigotos CC ($p=0,77$).

Del mismo modo, no observamos diferencias significativas al realizar el análisis estratificado de la SLE respecto al tipo histológico. En los adenocarcinomas: los pacientes con genotipo TT muestran una SLE del 75%, del 70% en los pacientes con genotipo TC y del 71% en los pacientes con genotipo CC ($p=0,76$). En el grupo de los tumores mucinosos observamos una SLE en los homocigotos mutados del 100%, en los heterocigotos del 43% y del 49% en los homocigotos “silvestres” ($p=0,57$).

Al estudiar el grado de diferenciación, observamos en el grupo de pacientes con tumores de grado I que su SLE es del 80% en los homocigotos TT, del 63% en los heterocigotos TC y del 73% en los homocigotos CC ($p=0,17$). En los pacientes con tumores de grado II observamos una SLE del 100% en los de genotipo TC y del 70% en aquellos con genotipo CC ($p=0,19$). En el grupo de tumores de grado III la SLE de los pacientes heterocigotos es del 67% y del 56% en homocigotos “silvestre” ($p=0,50$).

Variable	Categorías	VEGF +936 C/T	SLE (EE) (85meses)	n	p
Sexo	Hombres	TT	100% (---)	1	0,76
		TC	64% (7,8%)	16	
		CC	70% (4,9%)	37	
	Mujeres	TT	75% (21,7%)	2	0,76
		TC	71% (9,3%)	12	
		CC	71% (4,8%)	39	

Edad	> 70	TT	100% (---)	4	0,28
		TC	63% (8,8%)	8	
		CC	69% (4,9%)	30	
	≤ 70	TT	0% (%)	0	0,76
		TC	70% (8,1%)	20	
		CC	72% (4,7%)	46	
Dukes	A+B	TT	100% (---)	3	0,72
		TC	83% (5,9%)	22	
		CC	82% (3,7%)	57	
	C	TT	50% (35,4%)	1	0,37
		TC	41% (11,1%)	6	
		CC	57% (6,7%)	17	
	D	TT	---		0,45
		TC	0% (0,0%)	0	
		CC	21% (12,0%)	2	
Localización	Colon	TT	100% (---)	2	0,60
		TC	66% (8,1%)	15	
		CC	67% (4,7%)	39	
	Recto	TT	67% (27,2%)	2	0,77
		TC	68% (9,0%)	13	
		CC	75% (4,9%)	37	
Histología	Adenocarcinoma	TT	75% (2,2%)	2	0,76
		TC	70% (6,2%)	25	
		CC	71% (3,4%)	75	
	Mucinoso	TT	100% (---)	1	0,57
		TC	43% (18,7%)	3	
		CC	49% (16,6%)	1	
Grado de diferenciación	I	TT	80% (17,9%)	3	0,17
		TC	63% (7,2%)	18	
		CC	73% (4,0%)	59	
	II	TT	---		0,19
		TC	100% (---)	6	
		CC	70% (7,4%)	11	
	III	TT	---		0,50
		TC	67% (27,2%)	1	
		CC	56% (16,6%)	2	

Tabla 65. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en el estudio del polimorfismo VEGF +936 C/T. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

ALELOS DEL POLIMORFISMO VEGF +936 C/T

1. Alelo C del polimorfismo VEGF+936 C/T

Hemos realizado un análisis estratificado de la SLE entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y el alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T (tabla 66).

En el análisis estratificado de la SLE respecto a la sexo observamos que en los hombres la SLE es del 68% en los portadores del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T y del 100% en los no portadores ($p=0,54$). En las mujeres observamos que las portadoras del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T tienen una SLE del 71% y del 75% las que no portadoras ($p=0,58$).

El análisis estratificado de la SLE respecto a la edad nos muestra en el grupo de pacientes mayores de 70 años una SLE del 67% en aquellos pacientes en los que está presente el alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T y del 100% en aquellos que no lo tienen ($p=0,22$). En el grupo de pacientes con edad menor a 70 años o de esa edad: los portadores del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T muestran una SLE del 71% y del 0% los no portadores de dicho alelo ($p=0,48$).

No observamos diferencias estadísticamente significativas al realizar el análisis estratificado de la SLE respecto al estadio de Dukes. En los pacientes con tumores en estadio A o B portadores del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T observamos una SLE del 82% y del 100% en aquellos que no tienen este alelo ($p= 0,44$). En los pacientes en estadio C la SLE es del 53% en el caso de pacientes portadores del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T y en los no portadores la SLE es del 50% ($p= 0,56$).

En el estadio D los portadores del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T muestran una SLE del 18%.

Respecto a la localización tumoral, observamos una SLE en los tumores del colon del 67% en los pacientes con el alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T y del 100% en ausencia del alelo ($p=0,38$). En los tumores del recto los pacientes portadores de este alelo muestran una SLE del 73% y en los no portadores del 67% ($p=0,85$).

Respecto al análisis estratificado de la SLE y la histología: el grupo de los adenocarcinomas muestra una SLE del 71% para los pacientes que portan el alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T y del 75% en los no portadores ($p=0,58$). En los tumores mucinosos la SLE es del 45% en los portadores de este alelo y del 100% en ausencia del alelo ($p=0,40$).

Así mismo no observamos diferencias estadísticamente significativas en el análisis estratificado de la SLE respecto al grado de diferenciación. Este análisis nos muestra en los pacientes con grado I portadores del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T una SLE del 71% y en los no portadores del 80% ($p=0,46$). En los pacientes con grado de diferenciación II portadores del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T observamos una SLE del 73%. En el caso de pacientes con tumores en grado III la SLE es del 58% en los portadores del alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T.

Variable	Categorías	Alelo C	SLE (EE) (85meses)	n	p
Sexo	Hombres	C	68% (4,2%)	53	0,54
		no C	100% (---)	1	
	Mujeres	C	71% (4,2%)	51	0,58
		no C	75% (21,7%)	2	
Edad	> 70	C	67% (4,3%)	38	0,22
		no C	100% (---)	4	
	≤ 70	C	71% (4,1%)	66	0,48
		no C	0% (0,0%)	0	
Dukes	A+B	C	82% (3,2%)	79	0,44
		no C	100% (---)	3	
	C	C	53% (5,8%)	23	0,56
		no C	50% (35,4%)	1	
	D	C	18% (10,5%)	2	---
		no C	---	---	
Localización	Colon	C	67% (4,0%)	54	0,38
		no C	100% (---)	2	
	Recto	C	73% (4,3%)	28	0,85
		no C	67% (2,72%)	2	
Histología	Adenocarcinoma	C	71% (3,0%)	100	0,58
		no C	75% (21,7%)	2	
	Mucinoso	C	45% (12,4%)	4	0,40
		no C	100% (---)	1	
Grado de diferenciación	I	C	71% (3,6%)	77	0,46
		no C	80% (17,9%)	3	
	II	C	73% (6,7%)	15	---
		no C	---	---	
	III	C	58% (14,2%)	3	---
		no C	---	---	

Tabla 66. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el alelo C del polimorfismo VEGF +936 C/T de los pacientes con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

2. Alelo T del polimorfismo VEGF+936 C/T

Se ha estudiado la SLE de los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y la presencia o ausencia del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T (tabla 67).

En relación al sexo de los pacientes, observamos que los hombres portadores del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T tienen SLE del 65% y la de los no portadores del 70% ($p=0,76$). En las mujeres portadoras del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T la SLE es del 71% y la de las no portadoras del 70% ($p=0,80$).

Con respecto a la edad de los pacientes, en el grupo de pacientes mayores de 70 años la SLE es del 68% en los portadores del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T y del 69% en los no portadores ($p=0,58$). En el caso de los pacientes de 70 años o menores la SLE de los portadores del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T es del 67% y del 71% para los que no presentan este alelo ($p=0,76$).

En el análisis estratificado del estadio de Dukes, aquellos pacientes con tumores en estadio A o B muestran una SLE del 84% en los pacientes que tenían el alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T mientras que en aquellos que no presentaban este alelo la SLE es del 82% ($p=0,97$). En el grupo de pacientes con tumores en estadio C la SLE es del 41% en el caso de los portadores del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T y del 57% en aquellos que no presentaban dicho alelo ($p=0,29$). En los tumores en estadio D observamos una SLE del 0% para los pacientes portadores alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T y del 21% para los no portadores de dicho alelo ($p=0,45$).

Al estratificar según la localización tumoral observamos que los pacientes con los tumores localizados en el colon tienen una SLE del 68% cuando son portadores del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T y del 67% en los no portadores ($p=0,78$). En

el grupo de pacientes con tumores localizados en recto la SLE es del 67% para aquellos que presentan el alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T y del 75% para aquellos que no lo portan ($p=0,54$).

Respecto al análisis estratificado del tipo histológico observamos que en adenocarcinomas la SLE en los pacientes que tienen el alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T es del 70% y del 71% para los que no lo presentaban ($p=0,73$). En el caso de los tumores mucinosos los portadores de dicho alelo muestran una SLE del 50% y los no portadores del 47% ($p=0,74$).

Como en los anteriores casos no observamos diferencias estadísticamente significativas al estudiar el grado de diferenciación, en el grupo de tumores de grado I la SLE de los portadores del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T es del 64% y del 73% en el caso de los no portadores ($p=0,15$). En el caso de los tumores de grado II la SLE es del 100% para los pacientes portadores del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T y del 70% para los no portadores ($p=0,19$). En los tumores de grado III se observa una SLE del 67% para los pacientes que tienen alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T y para los que no lo tienen del 57% ($p=0,50$).

Variable	Categorías	Alelo T	SLE (EE) (85meses)	n	p
Sexo	Hombres	T	65% (7,7%)	17	0,76
		no T	70% (4,9%)	38	
	Mujeres	T	71% (8,6%)	14	0,80
		no T	70% (4,8%)	39	
Edad	> 70	T	68% (8,1%)	11	0,58
		no T	69% (4,9%)	30	
	≤ 70	T	67% (8,1%)	20	0,76
		no T	71% (4,7%)	46	
Dukes	A+B	T	84% (5,5%)	24	0,97
		no T	82% (3,7%)	57	
	C	T	41% (10,7%)	7	0,29
		no T	57% 6,7(%)	17	
	D	T	0% (0,0%)	0	0,45
		no T	21% (12,0%)	2	
Localización	Colon	T	68% (7,7%)	16	0,78
		no T	67% (4,7%)	39	
	Recto	T	67% (8,6%)	15	0,54
		no T	75% (4,9%)	37	
Histología	Adenocarcinoma	T	70% (6,0%)	27	0,73
		no T	71% (3,4%)	75	
	Mucinoso	T	50% (17,7%)	4	0,74
		no T	47% (16,6%)	4	
Grado de diferenciación	I	T	64% (6,8%)	21	0,15
		no T	73% (4,1%)	59	
	II	T	100% (---)	6	0,19
		no T	70% (7,4%)	11	
	III	T	67% (27,2%)	1	0,50
		no T	57% (16,6%)	2	

Tabla 67. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en relación con el alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T de los pacientes con CCR. Serie de 342 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

E.4. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad entre los factores pronóstico y delección en la región 9a del gen EphB2

Hemos estudiado la SLE de los pacientes con CCR mediante un análisis estratificado entre las variables clínico-patológicas y los factores pronóstico clásicos y presencia de delección en la región 9A del gen EphB2.

De este análisis concluimos que los pacientes con adenocarcinoma y delección en la región 9A del gen EphB2 muestran una mejor supervivencia libre de enfermedad a los 85 meses ($p=0,08$) (tabla 68). Presentan un 95% de reducción de la tasa de recidiva frente a los adenocarcinomas sin delección en dicha región ($HR= 0,05$; $IC95\%$ 0,00-48,73; $p= 0,08$) (figura 22).

Variable	Categorías	Delección	SLE (EE) (85meses)	n	HR	IC 95%	p
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Deleccionado	100% (---)	8	0,05	0,00-48,73	0,08
		No deleccionado	72% (3,1%)	99			
	Mucoide	Deleccionado	0% (0,0%)	0	3,76	0,72-19,58	0,16
		No deleccionado	58% (12,2%)	6			

Tabla 68. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en el estudio de delección en la región 9A del gen Ephb2. Serie de 323 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Noviembre 2009).

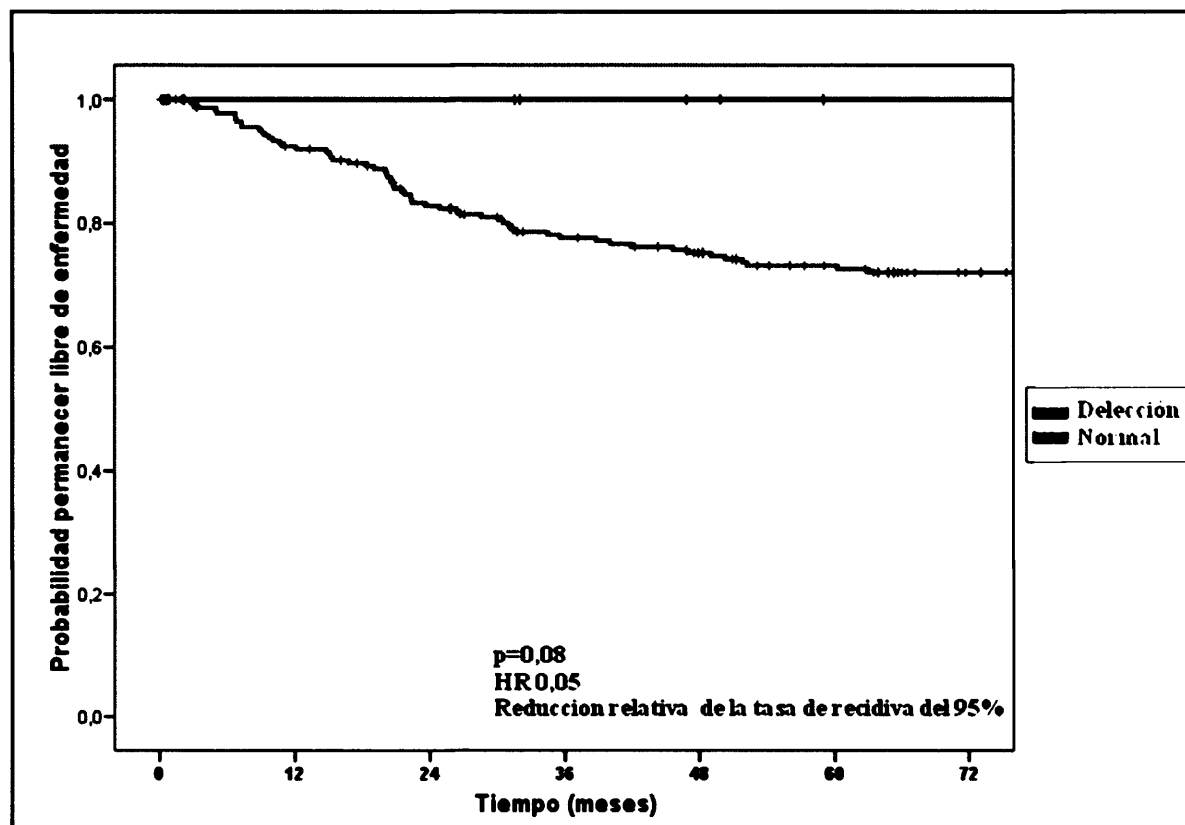


Figura 22. Curva de supervivencia libre de enfermedad acumulada de los pacientes con adenocarcinoma colorrectal según la presencia de delección en la región 9A del gen EphB2. Serie de 323 pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo1995-Noviembre 2009)

VIII.F. Análisis multivariante de la supervivencia libre de enfermedad

En este estudio no hemos encontrado con nuestro tamaño muestral que alguna de las variables estudiadas se comporte como un factor pronóstico.

Sin embargo el adenocarcinoma parece ser un factor de buen pronóstico ajustado por estadio ($p < 0,001$; HR indeterminado; IC95% = ---)

-DISCUSIÓN-

La angiogenesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos. Es un proceso necesario para el desarrollo, crecimiento y diseminación de los tumores sólidos. Los tumores sintetizan factores angiogénicos y anti-angiogénicos que estimulan la angiogenesis tumoral, la migración endotelial, proliferación y la morfogenesis capilar. Los nuevos vasos formados aportan nutrientes y oxígeno al tumor y eliminan sustancias de desecho de las células malignas, promueven estímulos paracrinos y permiten la diseminación de células neoplásicas^{380,381}.

El VEGF es un agente angiogénico muy potente que tiene un papel importante en la neovascularización del tumor, es decir en su progresión y metástasis, también está implicado en la tumorigenesis³⁸². Induce la proliferación y migración de células endoteliales, inhibe la apoptosis y aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos^{383, 384}. Además regula la actividad endotelial y actúa como un regulador multifuncional de las células inmunes e inflamatorias³⁸⁵. Debido a estas funciones se están investigando nuevas terapias antineoplásicas cuya diana es esta molécula.

Esta molécula desempeña un papel importante en la progresión de numerosas malignidades sólidas, incluyendo CCR. Varios estudios sugieren que hay una asociación entre la expresión del gen VEGF y la angiogenesis tumoral, el pronóstico de neoplasias y sus metástasis^{385, 386,387}. Arii et al han demostrado que la molécula VEGF promueve la angiogenesis en varias neoplasias (hepatocarcinoma, cáncer de esófago, cáncer pancreático) y que en cáncer de esófago y CCR es responsable de la metástasis, además es factor pronóstico porque induce la neovascularización del tumor y potencia la actividad proliferativa en el órgano diana³⁸⁸.

Estudios preclínicos y clínicos indican que el VEGF es el factor angiogénico predominante en cáncer de colon. Está implicado en el desarrollo y crecimiento del CCR porque se expresa en etapas iniciales de la progresión del CCR ³⁸⁹, en los tumores hay una mayor expresión de la molécula que en la mucosa ³⁹⁰. El VEGF está asociado con la invasividad, densidad vascular, la formación de metástasis, recurrencia y pronóstico ^{228, 391, 392}. Su sobreexpresión se correlaciona con un peor pronóstico ³⁹³. Un meta-análisis de 27 estudios demuestra que la sobreexpresión del gen VEGF se relaciona significativamente con una menor SG y con un aumento del riesgo de recaída ³⁷¹. Además es predictor del riesgo de metástasis ³⁷² y factor predictivo de la respuesta al tratamiento ^{373, 374}.

Ya que la familia del gen VEGF tiene un importante papel relacionado con la angiogenesis tumoral se está investigando la significación funcional y clínica de sus polimorfismos. Los polimorfismos son variaciones en la secuencia del ADN. Aproximadamente el 90% de los polimorfismos son sustituciones en una sola base de la secuencia de ADN (SNPs). La mayoría de los polimorfismos no causan ningún efecto, sin embargo algunos de ellos provocan cambios en la regulación de la expresión génica o en la función de la proteína codificada por ese gen. A pesar de su baja prevalencia estos polimorfismos pueden afectar a la vía angiogénica, causar diferencias entre las personas en la susceptibilidad y/o severidad de malignidades, ya sea solos, por interacción de unos polimorfismos con otros o junto a factores ambientales ³⁹⁴. Los polimorfismos localizados dentro de la región reguladora de la transcripción del gen VEGF pueden causar diferencias en su expresión, provocar una alteración en su producción y/o actividad de su proteína, influenciar el proceso de la angiogenesis y progresión tumoral o provocar resistencia a tratamientos ³⁹⁵. Por todo ello estas

variaciones pueden afectar al pronóstico del cáncer. Además pueden contribuir a la susceptibilidad individual al cáncer ³⁹⁶. También podrán ser utilizados como marcadores predictivos de gran ayuda para dirigir una terapia individual puesto que podrán ayudar a identificar a subgrupos de pacientes de mejor o peor pronóstico, además de ayudar a tomar decisiones terapéuticas ya que la molécula VEGF es una diana de la terapia anti-cáncer ²²⁰.

Varios estudios confirman que algunos SNPs del gen VEGF pueden causar diferencias entre los individuos en la susceptibilidad y progresión de neoplasias debido a que provocan diferencias en la expresión génica y por tanto en la producción y nivel plasmático de VEGF ^{219, 222, 395, 397}. Como hemos dicho, su expresión se relaciona directamente con el tamaño del tumor, metástasis y con el pronóstico, tanto en tumores sólidos como en hematológicos. La sobreexpresión de ARN mensajero del VEGF y de su proteína se ha asociado con la progresión tumoral y un peor pronóstico en varias neoplasias (melanoma, ovario, próstata, colon) ³⁷⁰.

Un cambio de C a T en la posición +936 del gen VEGF se correlaciona con una menor síntesis de la molécula VEGF ³⁹⁸. Es decir que los individuos con el alelo T del polimorfismo +936 C/T tienen menor concentración plasmática de VEGF ²²².

En un estudio realizado con 143 mujeres con cáncer de ovario se demostró que el alelo VEGF -2578C se asocia significativamente ($p < 0,03$) con niveles plasmáticos altos de VEGF ³⁹⁹. En otra investigación realizada en 387 receptores y 306 donantes de riñón se observó que los portadores del alelo -2578C y -1154G están asociados con una mayor síntesis de VEGF ⁴⁰⁰. Estas observaciones son corroboradas por otros trabajos como el de Mohammadi et al en donde concluyen que los genotipos -1154G/G y -2578C/C se relacionan significativamente con un aumento en la síntesis de VEGF ³⁹⁷.

⁴⁰². Koukourakis et al encontraron una asociación entre los genotipos VEGF -2578 C/A y -1154 G/G y una mayor concentración de VEGF en sangre ⁴⁰². Por tanto es razonable pensar que los pacientes portadores del alelo -1154G o/y -2578C tendrán mayor expresión del gen, mayor concentración plasmática de VEGF. Ésto es apoyado por el estudio de Lambrechts quien observa que los haplotipos que tienen el alelo -2578C tienen niveles plasmáticos de VEGF mayores ⁴⁰³.

Sin embargo en una investigación llevada a cabo por Cacev et al en una población de pacientes de CCR llegaron a la conclusión de que los polimorfismos del gen VEGF -1154 G/A no influyen en la expresión del VEGF ni en la susceptibilidad a CCR aunque no se descarta el papel de otros polimorfismos ⁴⁰⁴.

Respecto a su influencia en la susceptibilidad al cáncer, varios polimorfismos del gen VEGF se han relacionado con algunos tipos de cáncer y el riesgo de desarrollarlos. Se han realizado numerosos estudios clínicos en los que se ha concluido que hay polimorfismos del gen VEGF implicados en el desarrollo de tumores sólidos como el melanoma, pulmón, próstata y el de mama, además en la evolución de estos cánceres la angiogenesis es un mecanismo importante ³⁷⁰. El polimorfismo +936 C/T se asocia con la susceptibilidad al cáncer, algunos investigadores encuentran una asociación entre el alelo 936T y un riesgo menor de cáncer ^{405, 406, 407}. Un estudio reciente demuestra que la prevalencia del alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T (que se asocia a una menor concentración plasmática de VEGF) es menor en pacientes con cáncer de mama que en sanos indicando que esta variante genética puede tener un papel protector contra el cáncer de mama ³⁹⁸, es decir el alelo 936T disminuye el riesgo de cáncer de mama (OR=0,51; IC 95%=0,38-0,70). También se ha relacionado este mismo alelo con un menor riesgo de cáncer de pulmón de células pequeñas ⁴⁰⁸.

El genotipo -1154 A/A se asocia con un menor riesgo de desarrollar cáncer de próstata y con un menor potencial invasivo en el melanoma maligno ^{409, 410}. Esto apoya las investigaciones que concluyen que el alelo -1154A se asocia a una menor expresión del gen VEGF.

Por otro lado, algunos autores observan que los polimorfismos 936C/T, 2578 C/A no modifican el riesgo de desarrollar CCR ^{220, 404}.

Aún se desconocen los mecanismos en los que intervienen durante la tumorigenesis o desarrollo de metástasis. Es necesario un mayor conocimiento sobre las funciones de estos polimorfismos del gen VEGF porque nos ayudarán a comprender mejor la biología y comportamiento tumoral además de clarificar los datos de los estudios realizados ²²⁰.

Las moléculas EphB pertenecen a la familia de receptores tirosin-quinasa. Los receptores EphB ejercen un papel esencial en la migración celular y en el mantenimiento de la arquitectura tisular ²⁸⁰. Controlan la migración y guía axonal ⁴¹¹. Son reguladores de la proliferación de las células progenitoras ^{273, 284}. Controlan las interacciones intracelulares (incluyendo las células endoteliales y las células epiteliales especializadas) implicadas en el crecimiento celular, la migración, adhesión y polaridad de las células ²⁸⁰. EphB2 mantiene la integridad y la arquitectura de la cripta colónica ⁴¹².

EphB2 comparte entre el 49% y el 66% de homología aminoacídica con otros miembros de EphB pero la homología entre el EphB2 humano y el de ratón es del 99% es decir su función se ha conservado a lo largo de la evolución ²⁶⁵.

Se ha observado la expresión de EphB en distintos tumores: pulmón ²⁶², colon ²⁶⁷, endometrio ²⁸⁹, osteosarcoma ²⁷¹, neuroblastoma ⁴¹³. También se ha observado la expresión de EphB2 en distintos cánceres: CCR, estómago, esófago ²⁶⁵, neuroblastoma ⁴¹³, osteosarcoma ²⁷¹. Sin embargo aún se desconoce su papel en la invasión o metástasis ²⁹¹.

La mayoría de los CCR esporádicos se deben a la activación de la vía Wnt. En el epitelio colónico sano la señalización Wnt está activa, es la responsable de mantener las células en un estado proliferativo, esta vía se inactiva en las células maduras ⁴¹⁴. El 70% de los CCR muestran una inactivación del gen supresor APC que activa la vía Wnt, esto permite la sobreproducción de células en división ⁴¹⁵. El EphB2 es un efector de la vía Wnt, aunque esta vía permanezca activa, la mayoría de los CCR expresan bajos niveles de EphB2 en la transición de adenoma a carcinoma ²⁸⁴. La disminución de su expresión se correlaciona con el grado de malignidad, acelera la tumorigenesis en el colon y recto de ratones $Apc^{min/+}$ e induce la formación de adenocarcinomas agresivos. La pérdida de expresión es un paso crítico en la progresión de CCR ²⁸⁴.

Es un candidato de gen supresor ya que su alteración puede influir en el comportamiento de las células neoplásicas a través de la pérdida de señales intercelulares y la arquitectura tisular ²⁸⁰. Existen datos contradictorios en los diferentes tipos de cáncer, especialmente en su función, como oncogen o gen supresor. En el cáncer de mama la sobreexpresión de EphB2 se correlaciona con peor pronóstico ²⁴¹. En el glioblastoma tiene mayor expresión que en el glioma y en el tejido cerebral sano y se

ha observado que su expresión promueve la migración e invasión de células del glioma *in vitro* ²⁹¹. EphB2 promueve la proliferación en el epitelio intestinal sano pero paradójicamente actúa como gen supresor en la carcinogenesis colónica ^{284, 273}. Esta función es consecuencia de su capacidad de regular la migración celular ³⁷⁵.

En el CCR hay una pérdida progresiva de la expresión de EphB2 en cada paso crítico de la carcinogenesis colorrectal. Battle et al examinaron una serie pequeña de adenomas y CCR, observaron una pérdida de expresión de EphB2 en la mayoría de los CCR pero no en adenomas o en criptas aberrantes a pesar de que la señalización Wnt estuviese activa en esos tumores. Además observaron que la reducción de la actividad de EphB por expresión transgénica de un dominante negativo EphB2 promovió la formación de tumor en el colon y recto de ratones $Apc^{min/+}$, esta evidencia indica que EphB2 suprime la progresión de CCR. Hay que tener en cuenta que el tamaño muestral de este estudio es pequeño ²⁸⁴. Sin embargo Guo et al corroboran el estudio anterior, observan que se expresa EphB2 en el 100% de las células de la base de la cripta del tejido colónico sano, en el 78% de los adenomas, en el 55,4% de los CCR primarios, en el 37,8% de las metástasis y sólo en el 32,9% de las metástasis hepáticas ($p < 0,001$ comparada con el CCR primario) ²⁹⁰. Estos estudios promueven una fuerte evidencia del papel supresor de EphB2. Se piensa que puede lograr su función supresora a través de la regulación de la supervivencia celular, adhesión y migración celular ²⁹⁰.

EphB2 tiene un papel en la tumorogenesis de promover la invasión de células tumorales y estimular la angiogenesis ⁴¹⁶. Nakada et al fueron los primeros en demostrar que EphB2 está implicado en los procesos de invasión del tumor y en la progresión maligna en tumores de cabeza. Este estudio demuestra que los niveles de ARNm de

EphB2 y su proteína en la forma fosforilada son significativamente mayores en el tejido de glioblastoma que en el tejido cerebral sano o en astrocitoma de bajo grado. Tanto datos *in vivo* como *in vitro* sugieren que la sobreexpresión de EphB2 en el tejido con glioma puede contribuir al comportamiento maligno del glioblastoma y puede conducir a la invasión de células de glioma en el tejido cerebral sano. Nakata et al correlacionan la fosforilación de EphB2 con la migración e invasión sin embargo el bloqueo de su activación inhibe la invasión del glioma *in vitro*, lo que sugiere un papel de EphB2 en el comportamiento invasivo de tumores astrocíticos malignos²⁹¹.

La pérdida de expresión de EphB2 se correlaciona con un peor pronóstico^{284, 412}. Guo et al concluyeron en su estudio que la pérdida de expresión de EphB2 se correlaciona en el CCR con un estadio más avanzado ($p=0,005$), pobre diferenciación ($p<0,001$), menor SG ($p=0,005$) y menor SLE ($p=0,001$)²⁹⁰. Otros investigadores describen en el CCR asociación entre sobreexpresión y una mejor SG y SLE²⁸⁵. Sin embargo Wu et al encuentran una asociación entre sobreexpresión y menor SG en el cáncer de mama en un estudio realizado en pacientes tratadas con resección con intención curativa. Esta discrepancia puede ser explicada por diferencias metodológicas o por distintas funciones de EphB2 en el CCR y en el cáncer de mama o por un tamaño muestral pequeño²⁴¹. En el cáncer de ovario también se observa una asociación entre altos niveles de EphB2 con peor pronóstico pero no se asocia con otras variables clínicas como estadio, tumor residual, tipo histológico o grado de diferenciación, en este estudio concluyen que EphB2 es un factor pronóstico en el cáncer de ovario⁴¹⁶. La sobreexpresión de EphB se asocia con mayor crecimiento tumoral, con la

tumorigenesis y con peor pronóstico en osteosarcoma, cáncer endometrial y melanomas ^{263, 270, 271}.

Senior et al encontraron una asociación entre un alta expresión de EphB2 y una menor migración de células colónicas neoplásicas ⁴¹².

In vitro los estudios demuestran que la sobreexpresión de EphB2 inhibe el crecimiento celular en el CCR y que su activación inhibe la adhesión y migración de células neoplásicas del colon ²⁹⁰.

Se están estudiando los mecanismos reguladores de la expresión de EphB2. Actualmente se conocen algunos mecanismos responsables de su inactivación como son la presencia de mutaciones en regiones repetitivas en el exón 17 o hipermetilaciones de citosinas de las islas CpG del promotor del gen EphB2. En el cáncer de próstata se ha observado que su inactivación mutacional es importante en la progresión y metástasis ²⁸⁰. El 8% de los cánceres prostáticos primarios y los metastatizados han sufrido inactivación mutacional de EphB2. Los estudios sugieren que la pérdida de señalización de EphB2 por inactivación mutacional puede afectar a algunos aspectos fenotípicos del cáncer prostático como crecimiento aberrante, invasión y metástasis ²⁹¹.

Por los motivos anteriormente mencionados hemos analizado tres polimorfismos del gen VEGF en el CCR con el objetivo de evaluar la posible asociación entre los polimorfismos del gen VEGF y las características clínico-patológicas del CCR. También hemos estudiado la delección en la región 9A del exón 17 del gen EphB2 y su relación con las variables clínico-patológicas del CCR. Así como el posible papel pronóstico de estos polimorfismos y de dicha delección. Hemos estudiado dos

polimorfismos localizados dentro de la región promotora del gen VEGF en la zona 5' UTR (-1154 G>A y -2578 C>A) y otro en la zona 3' UTR (VEGF +936 C>T).

Nuestro estudio no fue planteado para determinar si los polimorfismos estudiados de VEGF y/o la delección en la región 9A del exón 17 del gen EphB2 se pueden utilizar como factores de susceptibilidad para CCR, por esta razón no estudiamos dichos polimorfismos en una población de voluntarios sanos.

En nuestra población la distribución del polimorfismo VEGF -2578 A/C es: 22,9% AA, 48,7% AC y 27,5% CC. Estas frecuencias son similares a las descritas en el estudio realizado por Brogan (21,6%; 45,9% y 32,4% respectivamente) ³⁹⁵ y en el estudio realizado por Howell ⁴¹⁰. La población de este último estaba formada por pacientes con melanoma cutáneo maligno e individuos sanos. Las frecuencias de los pacientes eran 40,3%; 36,6% y 23,1% respectivamente. Las frecuencias del grupo control eran 30,8%; 43,2% y 25,9% respectivamente. En la distribución de estos dos grupos no existen diferencias significativas ($p=0,08$).

La frecuencia de su alelo C es de 0,52 y del A es de 0,48. Son similares a las halladas en otros artículos científicos, como en la investigación realizada por Langsenlehner: en pacientes con cáncer de mama la frecuencia del alelo A es 0,48 y es 0,52 para el C; en sanos son 0,47 y 0,53 respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre los sanos y los enfermos ($p=0,36$) ⁴¹⁷.

La distribución de frecuencias del polimorfismo VEGF -1154 G/A observada (22,3% AA, 35,5% G/A y 42,2% G/G) es equivalente a la que encontramos en la

literatura. La distribución de la población investigada por Heffler es: 12,5%; 41,4% y 12,5%⁴¹⁸. Y el estudio de Brogan muestra esta distribución: 9,0%; 41,4% y 9,0%.

La frecuencia del alelo -1154A es de 0,40 y del G es de 0,60

Lo mismo sucede con el polimorfismo +936 T/C. Nuestra distribución es: 1,4 % C/C, 21,4 % C/T y C/C 76,2%, es semejante a la descrita en la literatura, tanto en sanos como en pacientes^{223, 410}.

La frecuencia del alelo +936 C es 0,88 y del T es de 0,12. Estos resultados son paralelos a los publicados por otros investigadores, tanto en sanos como en enfermos de cáncer así como en caucasianos o japoneses^{396, 417, 419}, pero difiere en los coreanos cuya frecuencia para el alelo T es 0,209⁴²⁰.

Alazzouzi et al observaron mutaciones en la región 9A del exón 17 del gen EphB2 en el 21% de los adenomas con MSI (6/29) y en el 41% de los carcinomas (101/246)²⁷⁸. De las 101 mutaciones que observaron en dicha región en CCR el 93% (94/101) de ellas se debían a una delección de una adenosina, el 3% (3/101) a una delección de 2 adenosinas, el 2% (2/101) a una inserción de una adenosina, otro 2% a una delección de una timina. Estudiaron la misma región en muestras de tejido sano de los mismos pacientes que tenían mutación en el tejido tumoral y excluyeron que se tratase de polimorfismos o mutaciones en la línea germinal²⁷⁸. En nuestro estudio la frecuencia de portadores de delección en la región 9A del exón 17 del gen EphB2 es de 3,1% (10/323) y de no portadores es del 96,9% (313/323), la frecuencia de delección es menor que en el estudio de Alazzouzi et al. Otras publicaciones describen frecuencias mayores que la nuestra sin embargo son estudios de pacientes con CCR con MSI, así

Song et al describe que el 20,8% de su población muestral tienen dicha alteración ⁴²¹, Davalos et al publicaron una frecuencia de portadores de dicha alteración en el gen EphB2 del 39% de CCR con MSI y del 14% en el cáncer de endometrio ²⁷⁹.

Al igual que otros investigadores no hemos observado ninguna relación significativa entre las variables clínicas o los factores pronóstico clásicos en el CCR y el polimorfismo del gen VEGF -2578 C/A o el -1154 G/A.

Heffler et al no observaron ninguna asociación entre los polimorfismos VEGF -2578 C/A o -1154 G/A y el estadio tumoral, el grado de diferenciación y la edad en el momento del diagnóstico ⁴¹⁸. Tampoco Dassoulas et al encontraron una asociación entre los polimorfismos -1154G/A, -2478 C/A y +936 C/T y el tamaño del tumor, histología o estadio tumoral ⁴²². En un estudio realizado con 143 pacientes con cáncer de ovario se analizaron entre otros polimorfismos del gen VEGF el polimorfismo -2578 C/A, -1154 G/A y +936 C/T, se observó que ninguno de estos polimorfismos están relacionados significativamente con el tipo histológico, el grado, el estadio tumoral, la edad o el sexo ³⁹⁹.

Sin embargo Howell et al concluyen en su estudio que el genotipo VEGF -1154 AA se relaciona significativamente con el estadio I del melanoma maligno cutáneo ⁴¹⁰.

En nuestra investigación encontramos que en el polimorfismo VEGF -2578 C/A los pacientes de 70 años o de menor edad es menos frecuente la ausencia del alelo C que en los mayores ($p=0,02$).

Algunos investigadores asocian significativamente el alelo -2578C con un grado histológico mayor es decir con un peor pronóstico ²¹⁵ pero nosotros no hemos encontrado esta relación.

Respecto al polimorfismo VEGF +936 T/C encontramos una relación significativa con el sexo ($p=0,01$), el genotipo C/C es más frecuente en mujeres que en hombres, aunque su prevalencia es 0,02. También se relaciona con el estadio tumoral ($p=0,03$), el genotipo C/C es más frecuente en tumores en estadio D que el T/T, por tanto se asocia con estadios más avanzados del CCR es decir es un rasgo clinicopatológico adverso en el CCR ⁴²⁰. Sin embargo las investigaciones de Steffensen o Dassoulas no encuentran estas asociaciones, puede ser debido a la baja prevalencia del genotipo +936 T/T en las distintas poblaciones muestrales. También encontramos una asociación con el tipo de intervención realizada a los pacientes, aquellos con genotipo +936 T/T se asocian significativamente con cirugías curativas ($p=0,02$). No hallamos ninguna otra asociación con las demás características clínico-patológicas ni con los demás factores pronóstico clásicos al igual que otros investigadores ^{220, 399, 422}.

En nuestra población el alelo 936T es menos frecuente en mujeres que en hombres ($p=0,02$) al igual que en los tumores en estadio D, es decir se asocia con estadios precoces de la enfermedad ($p=0,01$). Otra asociación que hallamos es entre el tipo de cirugía y el alelo 936T ($p=0,007$). Aquellos enfermos que son portadores del alelo 936T son intervenidos con intención paliativa con menos frecuencia que aquellos que no tienen este alelo.

A diferencia de otros autores en nuestra investigación encontramos que la delección la región 9A del exón 17 del gen EphB2 se asocia con la localización tumoral, el 100% de los portadores de dicha delección tenían el tumor localizado en el colon proximal ($p< 0,001$). Pero al igual que otros investigadores no observamos asociaciones

con otras variables clínicas. Observamos que el 80% (8/10) de los portadores de dicha alteración son adenocarcinomas y que el 20% (2/10) restante son tumores mucinosos.

Hemos analizado la supervivencia en nuestra población. Para analizar la SG no tuvimos en cuenta aquellos pacientes que fallecieron debido a una patología diferente al CCR diagnosticado. En el análisis de la SLE excluimos aquellos pacientes a los que se les realizó una colectomía paliativa debido a la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico. El mismo cirujano ha realizado el seguimiento de estos pacientes, la mediana del tiempo de seguimiento es de 85,43 meses.

En el análisis de la SG con los factores pronóstico clásicos y con las variables clínico-patológicas sólo presentan un valor pronóstico el grado de diferenciación y el estadio tumoral. Los pacientes en estadio D tienen un riesgo de fallecer 20 veces mayor que los pacientes en estadios precoces (A+B) ($p < 0,001$). Aquellos enfermos con tumores indiferenciados tienen un riesgo de fallecer 1,72 veces superior a los tumores bien diferenciados ($p = 0,02$). Ni la delección en la región 9A del exón 17 del gen EphB2 ni ninguno de los polimorfismos del gen VEGF estudiados presenta valor pronóstico.

Los pacientes portadores de delección en la región 9A del exón 17 del gen EphB2 tienen un 30% de reducción relativa de la tasa de mortalidad frente a los pacientes que no tienen dicha alteración génica. Tenemos que destacar que los adenocarcinomas con delección en la región 9A del exón 17 del gen EphB2 tienen una SG del 100% ($p = 0,047$), los portadores de la delección presentan un 52% de reducción relativa de la tasa de mortalidad. Además en estos pacientes el adenocarcinoma parece ser un factor de buen pronóstico ajustado por estadio ($p < 0,001$).

En la literatura hay controversia de conclusiones, algunos científicos corroboran nuestros hallazgos ^{418,423}, sin embargo las investigaciones de otros autores revelan que estos polimorfismos son factores pronóstico independientes.

Dussoulas et al observan una menor SG en los individuos de genotipo +936 T/T y respecto al polimorfismo -2578 A/C el genotipo -2578 A/A muestra una menor supervivencia. Concluyen que en la población griega los polimorfismos del gen VEGF son marcadores pronóstico independientes ⁴²².

Un análisis multivariable con enfermos de CCR, realizado por Kim et al ²²³ muestra que el genotipo 936 C/T (SG: HR= 12,809; p < 0,001) y el +936 T/T (SG: HR 37,260; p < 0,001) se asocian con una menor SG que el genotipo 936 C/C. El mismo estudio muestra que el haplotipo -2578A / -634G / +936T se relaciona con una menor SG que el haplotipo “silvestre” -2578C / -634G / +936C (HR=3,866; IC 95%= 2,493-5,995; p < 0001). Concluyen que el polimorfismo +936 C/T del gen VEGF es factor pronóstico independiente en pacientes coreanos operados de CCR. El análisis del polimorfismo puede ayudar a identificar subgrupos de pacientes de mejor o peor pronóstico y a tomar decisiones terapéuticas. Al igual que nosotros no encontramos un valor pronóstico en el polimorfismo -2578 A/C ²²³. Además llegaron a la misma conclusión en otra investigación realizada con pacientes coreanos con cáncer gástrico: el polimorfismo VEGF +936 C/T es un marcador pronóstico independiente ⁴²⁴.

Nuestros resultados a pesar de no ser significativos muestran distintas frecuencias de SG: 75% en los individuos con genotipo +936 T/T, 65% los de genotipo 936 C/T y los de genotipo C/C 61%. Con nuestros datos obtenemos un 60% de reducción de la tasa de mortalidad en el homocigoto T/T frente al homocigoto C/C. Se

observa que el genotipo 936 T/T tiene una mejor supervivencia que el +936 C/T y T/T al contrario que en el estudio anterior. Esto se puede explicar por la baja prevalencia del genotipo T/T en todos los estudios. Es necesario hacer más investigaciones con poblaciones muestrales donde los genotipos tengan prevalencias similares.

Respecto a la SLE, el estadio de Dukes es el único que muestra un valor pronóstico de riesgo de recidiva. Los pacientes con CCR en estadio D tienen un riesgo de recidivar 3,27 veces superior al de los pacientes en estadio A o B ($p<0,001$). Ninguno de los polimorfismos estudiados ni la presencia o ausencia de delección en la región 9A del exón 17 del gen EphB2 son factores pronóstico de riesgo de recidiva. Aunque en el polimorfismo VEGF +936 C/T, los homocigotos T/T tienen un 43% de disminución relativa de la tasa de recidiva frente al homocigoto normal.

Respecto a la delección en la región 9A del exón 17 del gen EphB2, los adenocarcinomas con dicha delección tienen una mayor SLE ($p=0,08$), los portadores de la delección presentan un 95% de reducción relativa de la tasa de recidivar. Además en estos pacientes el adenocarcinoma parece ser un factor de buen pronóstico ajustado por estadio ($p<0,001$).

Estudios como el de Steffensen apoyan nuestra conclusión. Ellos realizaron una investigación con 143 pacientes con cáncer de ovario, analizaron entre otros polimorfismos de VEGF el polimorfismo -2578 C/A, -1154 G/A y +936 C/T no encontraron ninguna asociación entre los polimorfismos estudiados y la SLE³⁹⁹.

En un estudio realizado por Lurje et al⁴²⁵ en pacientes con CCR en estadio III encontraron una relación con el tiempo de recidiva y el polimorfismo +936, los

homocigotos C tenían una media de 2,6 años (IC 95% 1,7-5,7 años) y la media es de 11,1 años para el genotipo C/T y T/T (IC 95%= 6,6-12,4 años) ($p<0,003$), esto indica que este polimorfismo puede ser un factor pronóstico importante para los pacientes en estadio III además podría ayudar a identificar pacientes con mayor riesgo de recidiva.

Sin embargo otras investigaciones encuentran un valor pronóstico de riesgo de recidiva en el polimorfismo +936 C/T, el genotipo +936 T/T tiene un riesgo de recidiva 3,3 veces mayor que el genotipo C/C ²²³.

En conclusión, nuestras observaciones demuestran que el polimorfismo VEGF +936 C/T se puede asociar con características clínico-patológicas del CCR pero no el polimorfismo VEGF -2578 A/C o el -1154 G/A, al igual que en otras investigaciones. Además el polimorfismo VEGF +936 C/T se asocia con factores pronóstico clásicos de CCR, el alelo T se correlaciona con estadios más precoces. También encontramos que este alelo se asocia con cirugía curativa. Es decir se podría considerar como un posible marcador de buen pronóstico. Además, aunque no es estadísticamente significativo observamos que los pacientes con genotipo T/T tienen una mayor SG y SLE.

Sin embargo en la literatura hay conclusiones contradictorias sobre estas asociaciones, a pesar de estar de acuerdo en que el alelo +936T se asocia con una menor expresión del gen VEGF y que por tanto podría ser un marcador de buen pronóstico varias investigaciones observan que el genotipo +936 T/T se asocia con estadios más avanzados, con una menor SG y SLE y otros autores no encuentran estas asociaciones.

Una explicación para esta controversia sería una posible relación con otros polimorfismos desconocidos o SNPs desconocidos que jueguen un papel en las vías de señalización de la angiogenesis. Además el alelo +936 T tiene una baja prevalencia en

todas las investigaciones. Los polimorfismos varían entre las etnias por tanto son necesarios más estudios para clarificar la asociación entre los polimorfismos del gen VEGF y el CCR en las distintas poblaciones étnicas.

Para comprender el papel de los polimorfismos y haplotipos del gen VEGF en el desarrollo y progresión del CCR (y en otras neoplasias) son necesarios más estudios de sus funciones biológicas y de sus variantes genéticas.

En cuanto a la delección en la región 9A del exón 17 del gen EphB2 parece ser que es un factor de buen pronóstico en el adenocarcinoma de CCR. Sería de utilidad en la clasificación de los pacientes en grupos de mayor o menor riesgo y así poder aplicarles un tratamiento más individualizado. Debido a la baja frecuencia de esta alteración en nuestra población son necesarias más investigaciones para corroborarlo.

-CONCLUSIONES-

1. La distribución de las frecuencias de los polimorfismos VEGF -2578 C/A, VEGF -1154 G/A y VEGF +936 T/C en la población de pacientes con CCR no presenta diferencias significativas comparada con las descritas en la bibliografía en grupos control.
2. El 3,1% de los CCR estudiados son portadores de delección en la región 9A del exón 17 del gen EphB2. Todos ellos son heterocigotos para dicha alteración y se localizan en el colon proximal.
3. El alelo T del polimorfismo VEGF +936 C/T se asocia con estadios precoces del CCR, con una menor frecuencia en las cirugías paliativas y es menos frecuente en mujeres.
4. Los polimorfismos VEGF -2578 A/C, VEGF -1154 G/A, VEGF +936 C/T no presentan un valor pronóstico en el riesgo de mortalidad ni en el riesgo de recidiva.
5. El genotipo VEGF +936 T/T muestra un 60% de reducción de la tasa de mortalidad y un 43% de disminución relativa de la tasa de recidiva frente al homocigoto C/C.

6. Los portadores de delección en la región 9A del exón 17 del gen EphB2 tienen un 30% de reducción relativa de la tasa de mortalidad frente a los que no tienen esta delección.
7. La presencia de delección confiere una mayor SG a los pacientes con CCR. Los pacientes con adenocarcinomas portadores de la delección tienen un 52% de reducción relativa de la tasa de mortalidad frente a los pacientes con adenocarcinomas que no son portadores de la delección.
8. Los pacientes con adenocarcinoma y delección en la región 9A del exón 17 del gen EphB2 muestran, con una tendencia a la significación, una mayor SLE a los 85 meses. Estos pacientes tienen una reducción relativa del 95% de la tasa de recidiva.

-BIBLIOGRAFÍA-

BIBLIOGRAFÍA

1. Global action against cancer World Health Organization 2003
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005; 55: 74-108
3. Ferlay J, Autier M, Heanue M et al. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2006. Ann Oncol 2007; 18:581-592.
4. Lopez-Abente Ortega G, Pollán Santamaría M, Aragonés Sanz N. La situación del cáncer en España. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. MSC 2005.
5. Cabanes A, Pérez-Gómez B, Aragonés N, Pollán M, López-Abente G. La situación del cáncer en España, 1975-2006. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, 2009.
6. Center M, Jemal A, Smith R, Ward E. Worldwide Variations in Colorectal Cancer. CA Cancer J Clin 2009; 59: 366-378.
7. Ribes J, Navarro M, Clèries R, et al. Colorectal cancer mortality in Spain: trends and projections for 1985-2019. Eur J Gastroenterol Hepatol 2009; 21:92-100.
8. Grau J, Serradesanferm A, Polbach S et al. Programas de cribado del cáncer colorrectal en la población de riesgo medio en la Unión Europea y España. Gastroenterol Hepatol 2010; 33:111-118.
9. Cabanes Domenech A, Pérez-Gómez B, Aragonés N, Pollán M, López-Abente G. Vigilancia Epidemiológica del Cáncer. Monitorización de la situación del cáncer en España. Madrid, Junio 2009.
10. Casimiro C. Factores etiopatogénicos en el cáncer colorrectal. Aspectos genéticos y clínicos (primera de dos partes). Nutr Hosp 2002; XVII (2): 63-71.

11. Allen BA, Terdiman JP. Hereditary poliposis syndromes and hereditary non poliposis colorrectal cancer. *Brest Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 2:237-258.
12. de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev* 2004; 4:769-780.
13. Mecklin JP. The implications of genetics in colorectal cancer. *Ann Oncol* 2008; 19(5):87-90.
14. Strate LL, Syngal S. Hereditary colorectal cancer syndromes. *Cancer Causes Control*. 2005; 16(3):201-213.
15. Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous poliposis. *Am J. Gastroenterol* 2006; 101: 358-398.
16. Burt Rw, Disario Ja, Cannon-Albright L. Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Annu Rev Med* 1995; 46:371-379.
17. Davidson N. Genetic testing in colorectal cancer: Who, When, How and Why. *Keio J Med* 2007; 56 (1): 14-20.
18. Alburquerque C, Breukel C, Van der Luijt R, Fidalgo P, Lage P, Slors FJ, et al. The 'just right' signaling model: APC somatic mutations are selected base on a specific level of activation of the b-catenin signalling cascade. *Hum Mol Genet* 2002; 13: 1549-1560.
19. Lynch JP, Hoops TC. The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin N Am* 2002; 16:775-810.
20. Matloff ET, Brierley KL, Chimera CM. A clinician's guide to hereditary colon cancer. *Cancer J* 2004;10(5):280-287.
21. Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev.* 2007 Oct 15;21(20):2525-2538.

-
22. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinemann K, Fidalgo P, Phillips RK, Bisgaard ML, Orntoft TF, Aaltonen LA, Hodgson SV, et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in *Myc*. *N Engl J Med* 2003; 348: 791-799.
 23. Giardiello Fm, Brensinger Jd, Tersmette Ac, Goodman Sn, Petersen Gm, Booker Sv, et Al. Very high risk of cancer infamilial Peutz–Jeghers Syndrome. *Gastroenterol* 119(6):1447-1453.
 24. Giardiello FM, Trimbath JD. Peutz-Jeghers Syndrome and management recommendations. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4:408-415.
 25. Giardiello FM, Brensinger JD, Petersen GM. Aa technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterol* 2001; 121: 198-213.
 26. Järvinen H. Genetic testing for polyposis: practical and ethical aspects. *Gut* 2003; 52(2):19-22.
 27. Howe JR, Roth S, Ringold JC, et al. Mutations in the *SMAD4/DPC4* gene in juvenile polyposis. *Science* 1998; 280:1086-1088.
 28. Howe JR, Blair JA, Sayed MG, et al. Germline mutations of *BMPRIa* in juvenile polyposis. *Nat Genet* 2001; 28:184-187.
 29. Olschwang S, Serova-Sinilnikova OM, Lenoir GM, Thomas G. *PTEN* Germ-line mutations in juvenile polyposis coli. *Nat Genet*.1998; 18(1):12-14.
 30. Howe JR, Mitros FA, Summers RW. The risk of gastrointestinal carcinoma in familial juvenile polyposis. *Ann Surg Oncol* 1998; 5:751-757.
 31. Starink TM, Van der Veen JP, Arwert F, de Waal LP, de Lange GG, Gile JJ, et al. The Cowden sindrome: a clinical and genetic study in 21 patients. *Clin Genet* 1986; 29:222-233.

32. Allen BA, Terdiman JP. Hereditary poliposis syndrome and hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 2:237-258.
33. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang, SI, Zheng Z, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 1997; 16: 64-67.
34. Jass JR, Stewart SM. Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut*. 1992; 33(6): 783-786.
35. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch repair genes. *Int J Cancer* 1999; 81:214-218.
36. Rabelo R, Foulkes W, Gordon P, Wong N, Yuan ZQ, Macnamara E, et al. role of molecular diagnostic testing in familial adenomatous polyposis and hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 437-446.
37. Liu T, Yan H, Kuismanen S, et al. The role of HPMS1 and HPMS2 in predisposing to colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61:7798-802.
38. Vasen HFA, Watson P, Mecklin JP, et al. New Clinical criteria for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC, Lynch Syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterol* 1999; 116:1453-1456.
39. Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Nat Cancer Inst* 1999; 91:916-932.
40. Worthley DL, Leggett BA. Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *Clin Biochem Rev* 2010; 31(2):31-38.
41. Roh SA, Choi EY, Cho DH, Jang SJ, Kim SY, Kim YS, Kim JC. Growth and invasion of sporadic colorectal adenocarcinomas in terms of genetic change. *J Korean Med Sci* 2010; 25(3):353-360.

42. Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB et al. Physical activity obesity and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann Intern Med* 1995; 122:327-324.
43. Martínez ME, Giovannucci E, Spiegelman D, et al. Leisure-time physical activity, body size, and colon cancer in women. Nurses' Health Study Research Group. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 948-955.
44. Wolin KY, Yan Y, Colditz GA, Lee IM. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2009; 100(4):611-616.
45. Botteri E, Iodice S, Bagnardi S et al. Smoking and colorectal cancer. A meta-analysis. *JAMA* 2008; 300(23):2765-2778.
46. Pedersen A, Johansen C, Gronbaek M. Relations between amount and type of alcohol and colon and rectal cancer in a Danish population based cohort study. *Gut* 2003; 52:861-867.
47. Shimizu N, Nagata C, Shimizu H, et al. Height, weight and alcohol consumption in relation to the risk of colorectal cancer in Japan: a prospective study. *Br J Cancer* 2003; 88: 1038-1043.
48. Cho E, Smith-Warner SA, De Ritz J, et al. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med* 2004; 140: 603-613.
49. Willett WC. Goals for nutrition in the year 2000. *CA Cancer J Clin* 1999; 49:331-352.
50. Acheppac W, Bingham S, Bourtron-Rualt MC, Gerhardsson de Verdier M, Moreno V, Nagengast FM, t al. WHO Consensus statement on the role of nutrition in colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* 1999; 8:57-62.

-
51. Norat T, Bingham S, Ferrari P et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97(12):906-16.
52. Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 2003; 361:1496-1501.
53. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, et al. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *New Engl J Med* 1999; 340(3):169-176.
54. Shatzkin A, Lanza E, Corle D, et al. Lack of effect of a low fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. Polyp Prevention Trial Study Group. *N Engl J Med* 2000; 32:1149-1155.
55. Kushi LH, Byers T, Doyle C, Bandera EV et al American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J Clin.* 2006; 56(5):254-281.
56. Wysocki DK, Golden L, Burke L. Use of menopausal estrogens and medroxyprogesterone in the United States, 1982-1992. *Obstet Gynecol* 1995; 85:6-10.
57. Palmer JR, Louik C, Shapiro S, Rosenberg L: A case-control study of use of postmenopausal female hormone supplements in relation to the risk of large bowel cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 443-447.

58. Calle EE, Miracle-McMahill HL, Thun MJ, Heath CW Jr. Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:517-523.
59. Jänne PA, Mayer RJ. Quimioprevention of colorectal cancer. *New Engl J Med* 2000. 343(26):1960-1968.
60. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001; 48:526-535.
61. Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, et al. Colorectal cancer risk and mortality in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterol* 1992; 103:1444-1451.
62. Lennard-Jones JE, Morson BC, Ritchie JK, et al. Cancer surveillance in ulcerative colitis. Experience over 15 years. *Lancet* 1983; 2:149-152.
63. Gyde SN, Prior P, Allan RN, et al. Colorectal cancer in ulcerative colitis: a cohort study of primary referrals from three centers. *Gut* 1988; 1929:206-217.
64. Karlen P, Löfberg R, Broström O, et al. Increased risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol*.1999; 94:1047-1052.
65. Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, David G, Pandur T, Balogh M, Fischer S, Vargha P, Lakatos P. Risk factors for ulcerative colitis associated colorectal cancer in a Hungarian cohort of patients with ulcerative colitis: results of a population-based study. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12(3): 205-211.
66. Ekblom A, Helmick C, Zack M, et al. Ulcerative Colitis and Colorectal Cancer: A population-based study. *N Engl J Med* 1990; 323:1228-1233.
67. Itzkowitz SH, Present DH. Consensus Conference: Colorectal cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2005; 11:314-321.

-
68. Von Roon A, Reese G, Teare J, Constantinides V, Darzi A, Tekkis P. The risk of cancer in patients with Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 2007; 50(6): 839-856
69. Persson PG, Karlen P, Bernell O, et al. Crohn's Disease and cancer: A population-based cohort study. *Gastroenterology* 1994; 107:1675-1679.
70. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006; 127:469-480.
71. Bach SP, Renehan AG, Potten CS. Stem cells: The intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* 2000; 21:469-476.
72. Ponz de Leon M, Di Gregorio C. Pathology of colorectal cancer. *Digest Liver Dis* 2001; 33:372-388.
73. Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett* 1995; 93:55-71.
74. Tanaka T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *Journal of Carcinogenesis* 2009, 8: 1-19.
75. Snover DC, Jass JR, Fenoglio-Preiser C and Batts KP. Serrated polyps of the large intestine. *Am J Clin Pathol* 2005; 124:380-391.
76. Morimoto LM, Newcomb PA, Ulrich CM, Bostick RM, Lais CJ and Potter JD. Risk factors for hyperplastic and adenomatous polyps: evidence for malignant potential? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11:1012-1018.
77. Torlakovic E, Snover DC. Serrated adenomatous polyposis in humans. *Gastroenterology* 1996; 110:748-755.
78. Jeevaratnam P, Cottier DS, Browett PJ, et al. Familial giant hyperplastic polyposis predisposing to colorectal cancer: A new hereditary bowel cancer syndrome. *J Pathol* 1996; 179: 20-25.

-
79. Hawkins NJ, Ward RL. Sporadic colorectal cancers microsatellite instability and their possible origin in hiperplastic polyps and serrated adenomas. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1307-1313.
80. National Cancer Institute. Cancerweb. Genetics of colorectal cancer 208/10301. <Http://www.raylab.ac.uk/cancer-net/810301.html>
81. Melville DM, Jass JR, Morson BC, Pollock DJ, Richman PI, Shepherd NA, et al. Observer study of the grading of dysplasia in ulcerative colitis: comparison with clinical outcome. *Hum Pathol* 1989; 20: 1008-1014.
82. Ramirez M, Schierling S, Papaconstantinou HT, Thomas S. Management of the Malignant Polyp. *Clin Colon Rectal Surg* 2008; 21(4): 286-290.
83. Bosman FT. Prognostic value of pathological characteristics of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1995; 31:1216-1221.
84. Lanza G, Gala R, Matteuzzi M, Santini A. Medullarytype poorly differentiated adenocarcinoma of the large bowel: a distinct clinicopathologic entity characterized by microsatellite instability and improved survival. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2429-2438.
85. Eisen G, Weinberg D. Narrative review: screening for colorrectal cancer in patients with a first-degree relative with colonic neoplasia. *Ann Internal Med* 2005; 143:190-198.
86. Pinol V, Andreu M, Castells A. Synchronius colorrectal neoplasms in patient with colorectal cancer: predisponing individual and familiar factors. *Dis Colon Rectum* 2004; 47(7): 1192-2000.
87. Deschner EE, Winawer SJ, Katz S, Katzka I, Kahn E. Proliferative defects in ulcerative colitis patients. *Cancer Invest* 1983; 1:41-47.

88. Ponz de Leon M, Antonioli A, Ascari A, Zanghieri G, Sacchetti C. Incidence and familial occurrence of colorectal cancer and polyps in a health-care district of Northern Italy. *Cancer* 1987; 60:2848-2859.
89. Benito E, Obrador A, Stiggelbout A, Bosch FX, Mulet M, Munoz N, et al. A population-based case-control study of colorectal cancer in Majorca. I. Dietary factors. *Int J Cancer* 1990; 45:69-76.
90. Kampman E, Giovannucci E, vanVeer P, Rimm E, Stamfer MJ, Colditz GA, et al. Calcium, vitamin D, dairy foods, and the occurrence of colorectal adenomas among men and women in two prospective studies. *Am J Epidemiol* 1994; 139:16-29.
91. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319:525-532.
92. Boland CR, Sato J, Appelman HD, Bresalier RS, Feinberg AP. Microallelotyping defines the sequence and tempo of allelic losses at tumour suppressor gene loci during colorectal cancer progression. *Nature Med* 1995; 1:902-909.
93. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 661:759-767.
94. Anwar S, Frayling I M, Scott NA, Carlson GL. Systematic review of genetic influences on the prognosis of colorectal cancer. *British Journal of Surgery* 2004; 91: 1275-1291.
95. Delattre O, Olschwang S, Law DJ, Melot T, Remvikos Y, Salmon RJ, Sastre X, Validire P, Feinberg AP, Thomas G. Multiple genetic alterations in distal and proximal colorectal cancer. *Lancet* 1989; 2:353-356.

96. Gervaz P, Bouzourene H, Cerottini JP, Chaubert P, Benhattar J, Secic M, Wexner S, Givel JC, Belin B. Dukes B colorectal cancer: distinct genetic categories and clinical outcome based on proximal or distal tumor location. *Dis Colon Rectum* 2001; 44(3):364-372.
97. Li F, Lai M. Colorectal cancer, one entity or three. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2009; 10(3):219-229.
98. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260, 812-816.
99. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-819
100. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998 Nov 15; 58(22):5248-5257.
101. Blanes A, Diaz-Cano SJ. Complementary analysis of microsatellite tumor profile and mismatch repair defects in colorectal carcinomas. *World J Gastroenterol*. 2006; 12(37):5932-5940.
102. Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 735-740.
103. Peltomaki P. DNA mismatch repair and cancer. *Mutat Res* 2001; 488: 77-85.

104. Smith AJ, Stern HS, Penner M, Hay K, Mitri A, Bapat BV, et al. Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* 1994; 54:5527-5530.
105. Olschwang S, Hamelin R, Laurent-Puig P, Thuille B, De Rycke Y, Li YJ, Muzeau F, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G. Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Oct 28; 94(22):12122-12127.
106. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997; 386: 623-627.
107. Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3: 695-701.
108. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(7):721-733.
109. Sieber OM, Tomlinson IP, Lamlum H: The adenomatous polyposis coli (APC) tumour suppressor--genetics, function and disease. *Mol Med Today* 2000; 6:462-469.
110. Kawasaki Y, Senda T, Ishidate T, et al. Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science* 2000; 289:1194-1997.
111. He TC, Sparks AB, Rago C, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281:1509-512.
112. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398:422-426.
113. Nowak MA, Komarova NL, Sengupta A, Jallepalli PV, Shih IeM, Vogelstein B, Lengauer C. The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(25):16226-16231.

114. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359:235-237.
115. Polakis P. Mutations in the APC gene and their implications for protein structure and function. *Curr Opin Genet Dev.*1995; 5:66-71.
116. Miller JR, Hocking AM, Brown JD, et al. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene* 1999; 18:7860-7872.
117. Araki Y, Okamura S, Hussain SP, Nagashima M, He P, Shiseki M, Miura K, Harris CC. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the Wnt and ras pathways *Cancer Res.* 2003;63(3):728-734.
118. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88:323-331.
119. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris C. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253:49-53.
120. Takahashi M, Wakabayashi K. Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci* 2004; 95:475-480.
121. Grady WM, Markowitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; 3:101-128.
122. Molleví DG, Serrano T, Ginestà MM, Valls J, Torras J, Navarro M, Ramos E, Germà JR, Jaurieta E, Moreno V, Figueras J, Capellà G, Villanueva A. Mutations in TP53 are a prognostic factor in colorectal hepatic metastases undergoing surgical resection. *Carcinogenesis* 2007; 28(6):1241-1246.

123. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJ. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut* 2005; 54(9):1283-1286.
124. Levine A, Perry M, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, Welsh D. The 1993 Walter Hubert lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer*. 1994; 69:409-416.
125. Vogelstein B, et al. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000; 408:307-310.
126. Ghavam-Nasiri MR, Rezaei E, Ghafarzadegan K, Seilanian-Toosi M, Malekifard H. Expression of p53 in colorectal carcinoma: correlation with clinicopathologic features. *Arch Iran Med* 2007; 10(1):38-42.
127. Ljungman M. Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia* 2000; 2(3):208-225.
128. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:594-604.
129. Kastan MB, Canman CE, Leonard CJ. p53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1995; 14:3-15.
130. Kahlenberg MS, Stoler DL, Rodriguez-Bigas MA, Weber TK, Driscoll DL, Anderson GR, Petrelli NJ. p53 tumor suppressor gene mutations predict decreased survival of patients with sporadic colorectal carcinoma. *Cancer* 2000; 88(8):1814-1819.
131. Reale MA, Hu G, Zafar AI, Getzenberg RH, Levine SM and Fearon ER. Expression and alternative splicing of the deleted in colorectal cancer (DCC) gene in normal and malignant tissues. *Cancer Res* 1994; 54: 4493-4501.

132. Cho KR, Fearon ER. DCC: linking tumor suppressor genes and altered cell surface interactions in cancer? *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5(1):72-78.
133. Fearon ER. DCC: is there a connection between tumorigenesis and cell guidance molecules. *Biochim Biophys Acta* 1996; 9:1288(2):M17-M23.
134. Vogelstein Houlston RS. What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *Mol Pathol*. 2001; 54(4):206-214.
135. Forcet C, Ye X, Granger L, Corset V, Shin H, Bredesen DE, Mehlen P. The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(6):3416-3421.
136. Liu J, Yao F, Wu R, Morgan M, Thorburn A, Finley RL Jr, Chen YQ. Mediation of the DCC apoptotic signal by DIP13 alpha. *J Biol Chem* 2002; 277(29):26281-26285.
137. Itoh F, Hinoda Y, Ohe M, et al. Decreased expression of DCC mRNA in human colorectal cancers. *Int J Cancer* 1993; 53:260-263.
138. Iino H, Fukayama M, Maeda Y, et al. Molecular genetics for clinical management of colorectal carcinoma. *Cancer* 1994; 73:1324-1331.
139. Robinson MJ, Cobb MH: Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 180-186.
140. Eliceiri BP, Klemke R, Strömblad S and Cheresch DA: Integrin $\alpha_5\beta_3$ requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. *J Cell Biol* 1998; 14: 1255-1263.
141. Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA and Greenberg ME: Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 1999; 286:1358-1362.

142. Valencia A, Chardin P, Wittinghofer A, Sander C. The ras protein family: Evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* 1991; 30:4637-4648.
143. Georgieva M, Krasteva M, Angelova E, Ralchev K, Dimitrov V, Bozhimirov S, Georgieva E, Berger MR. Analysis of the K-ras/B-raf/Erk signal cascade, p53 and CMAP as markers for tumor progression in colorectal cancer patients. *Oncology Reports* 2008; 20: 3-11.
144. Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987; 56:779-827.
145. Ashktorab H, Brim H, Al-Riyami M, Date A, Al-Mawaly K, Kashoub M, Al-Mjeni R, Smoot DT, AL-Moundhri M, Al-Hashemi S, Ganguly SS, Raeburn S. Sporadic Colon Cancer: Mismatch Repair Immunohistochemistry and Microsatellite Instability in Omani Subjects. *Dig Dis Sci* 2008; 53:2723-2731.
146. Gervaz P, Bucher P, Morel P. Two colons-two cancers: paradigm shift and clinical implications. *J Surg Oncol* 2004; 88(4):261-266.
147. Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Ichikawa A, Maekawa M, Shitoh K, Igarashi S, Kotake K, Koyama Y, Nagai H. Extensive methylation of hMLH1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. *Gastroenterol.* 2001; 121(6):1300-1309.
148. Mitchell RJ, Farrington SM, Dunlop MG, Campbell H. Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 and colorectal cancer: a huge review. *Am J Epidemiol* 2002; 156:885-902.
149. Ward R, Meagher A, Tomlinson I, O'Connor T, Norrie M, Wu R, Hawkins N. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut* 2001; 48:821-829.

-
150. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998; 58:3455-3460.
151. Poynter JN, Siegmund KD, Weisenberger DJ, et al. Molecular characterization of MSI-H colorectal cancer by MLHI promoter methylation, immunohistochemistry, and mismatch repair germline mutation screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17:3208-3215.
152. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterol* 2008; 135:1079-1099.
153. Diaz-Cano SJ, Blanes A, Wolfe HJ. PCR techniques for clonality assays. *Diagn Mol Pathol* 2001; 10: 24-33.
154. Chaksangchaichot P, Punyarit P, Petmitr S. Novel hMSH2, hMSH6 and hMLH1 gene mutations and microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133(1):65-70.
155. Hamelin R, Chalastanis A, Colas C, El Bchiri J, Mercier D, Schreurs AS, Simon V, Svrcek M, Zaanani A, Borie C, Buhard O, Capel E, Zouali H, Praz F, Muleris M, Fléjou JF, Duval A. Clinical and molecular consequences of microsatellite instability in human cancers. *Bull Cancer* 2008; 95(1):121-132.
156. Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, Delachapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B, Modrich P. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 1993; 75:1227-1236.
157. Peltomäki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 735-740.
158. Peltomäki P. DNA mismatch repair and cancer. *Mutat Res* 2001; 488: 77-85.

159. Modrich P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet* 1991; 25:229-253.
160. Kolodner RD, Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9:89-96.
161. Marra G, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1114-1125.
162. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996; 2: 169-174.
163. Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 2008; 29(4):673-680.
164. Abdel-Rahman WM. Genomic instability and carcinogenesis: an update. *Curr Genomics* 2008; 9(8):535-541.
165. Perucho M. Correspondence re. Boland CR et al. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1999; 59:249-253.
166. Vidaurreta M, San-Casla MT, Maestro ML, Rafael S, Jiménez F, Arroyo M, Fernández C, Cerdán J. La inestabilidad de microsatélites predice un mejor pronóstico en los pacientes intervenidos de carcinoma colorrectal. *Med Clin* 2005; 124(4):121-125.

167. Sinicrope FA, Rego RL, Halling KC, et al. Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterol* 2006; 131:729-737.
168. Gafa R, Maestri I, Matteuzzi M, et al. Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer* 2000; 89:2025-2037.
169. Halling KC, French AJ, McDonnell SK, et al. Microsatellite instability and 8p allelic imbalance in stage B2 and C colorectal cancers. *J Natl Canc Inst* 1999; 91:1295-1303.
170. Lanza G, Gafa R, Santini A, et al. Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2006; 24:2359-2367.
171. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23:609-618.
172. Rodriguez-Bigas MA, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J. Natl Cancer Inst.* 1997; 89:1758-1762.
173. Gryfe R, Kim H, Hsieh E, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2000; 342:69-77.
174. Marcus VA, Madlensky L, Gryfe R, et al. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:1248-1255.
175. Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res* 1998; 4:1-6.

176. Ichikawa Y, Lemon SJ, Wang S, et al. Microsatellite instability and expression of MLH1 and MSH2 in normal and malignant endometrial and ovarian epithelium in hereditary nonpolyposis colorectal cancer family members. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999; 112:2-8.
177. Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 1993; 53:5849-5852.
178. Feeley KM, Fullard JF, Heneghan MA, et al. Microsatellite instability in sporadic colorectal carcinoma is not an indicator of prognosis. *J Pathol.* 1999; 188:14-17.
179. Gerves P, Cerottini JP, Bouzourene H, et al. Comparison of microsatellite instability and chromosomal instability in predicting survival of patients with T3N0 colorectal cancer. *Surgery* 2002; 131:190-197.
180. Shia J, Ellis NA, Paty PB, Nash GM, Qin J, Offit JK, Zhang X, MD, Markowitz AJ, Nafa K, Guillem JG, Wong WD, Gerald WL, Klimstra DS. Value of histopathology in predicting microsatellite instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2003; 27(11): 1407-1417.
181. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.
182. Albini A, Noonan DM, Ferrari N. Molecular pathways for cancer angioprevention. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 4320-4325.
183. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86: 353-364.

184. Menakuru SR, Brown NJ, Staton CA, Reed MWR. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Br J Cancer* 2008; 99:1961-1966.
185. Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocr Rev* 2004; 25: 581-611.
186. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23:1011-1027.
187. Shinkaruk S, Bayle M, Lain G, Délérís G. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003; 3(2):95-117.
188. Mattern J, Koomagi R, Volm M. Biological characterization of subgroups of squamous cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res* 1999; 5:1459-1463.
189. Matsushima H, Goto T, Hosaka Y, et al. Correlation between proliferation, apoptosis, and angiogenesis in prostate carcinoma and their relation to androgen ablation. *Cancer* 1999; 85:1822-1827.
190. Charpin C, Devictor B, Bergeret D, et al. CD31 quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas. Correlation with current prognostic factors. *Am J Clin Pathol* 1995; 103:443-448.
191. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Kakolyris S, et al. Vascular endothelial growth factor, wild-type p53, and angiogenesis in early operable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:3017-3024.
192. Turner HE, Nagy Z, Gatter KC, et al. Proliferation, bcl-2 expression and angiogenesis in pituitary adenomas: relationship to tumor behaviour. *Br J Cancer* 2000; 82:1441-1445.

193. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, et al. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994; 265:1582-1584.
194. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, et al. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 2000; 14:34-44.
195. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;3:401-410.
196. Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*.1991; 324:1-8.
197. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676.
198. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219(4587):983-985.
199. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246(4935):1306-1309.
200. Belizon A, Balik E, Feingold DL, Bessler M, Arnell TD, Forde KA, Horst PK, Jain S, Cekic V, Kirman I, Whelan RL. Major abdominal surgery increases plasma levels of vascular endothelial growth factor: open more so than minimally invasive methods. *Ann Surg* 2006 Nov;244(5):792-798.
201. Jain RK. Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science* 2005;307:58-62

-
202. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: A new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 2001; 7:987-989.
203. Jubb AM, Oates AJ, Holden S, Koeppen H. Predicting benefit from anti-angiogenic agents in malignancy. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:626-635.
204. Jain L, Vargo CA, Danesi R, Sissung TM, Price DK, Venzon D, Venitz J, Figg WD. The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(9):2496-2508.
205. Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res* 2005; 65: 671-680.
206. Shojaei F, Ferrara N. Role of the microenvironment in tumor growth and in refractoriness/resistance to anti-angiogenic therapies. *Drug Resist Updat* 2008;11(6): 219-230
207. Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:579-591.
208. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001; 26(1):25-35.
209. Roskoski R Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev in Oncol Hematol* 2007; 62:179-213.
210. Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 down-modulates vpf/vegf receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J Biol Chem* 2001;276:26969-26979.

211. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003;9:936-943.
212. Schultheis AM, Lurje G, Rhodes KE, Zhang W, Yang D, García AA, Morgan R, Gandara D, Scuder S, Oza A, Hirte H, Fleming F, Roman L, Lenz HJ. Polymorphisms and clinical outcome in recurrent ovarian cancer treated with cyclophosphamide and bevacizumab. *Clin Cancer Res* 2008; 14:7554-7563.
213. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; 87:3336-3343.
214. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994; 269:26988-26989
215. Jacobs EJ, Feigelson HS, Bain EB, Brady KA, Rodriguez C, Stevens VL, Patel AV, Thn MJ, Calle EE. Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and the breast cancer in the Cancer Prevention Study II cohort. *Breast Cancer Res.* 2006; 8:R22.
216. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991; 5:1806-1814.
217. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266:11947-11954.

218. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996; 93: 1493-1495.
219. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* 2000; 12: 1232-1235.
220. Hofmann G, Langsenlehner U, Renner W, Langsenlehner T, Yazdani-Biuki B, Clar H, Gerger A, Wehrschoetz M, Samonigg H, Krippel P. Common single nucleotide polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and colorectal cancer risk. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134(5):591-595.
221. Ku KT, Wan L, Peng HC, Tsai MH, Tsai CH, Tsai FJ. Vascular endothelial growth factor gene-460 C/T polymorphism is a biomarker for oral cancer. *Oral Oncol* 2005; 41: 497-502.
222. Renner W, Kotschan S, Hoffman C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial factor plasma levels. *J Vasc Res* 2000; 37: 443-448.
223. Kim JG, Chae YS, Sohn SK, Cho YY, Moon JH, Park JY, Jeon SW, Lee IT, Choi GS, Jun SH. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms associated with prognosis for patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(1):62-66.
224. Kong SY; Park JW, Lee JA, Park JE, Park KW, Hong EK, Kim CM. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and survival in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatology* 2007; 46:446-455.

225. Zhang HT, Craft P, Scott PA, et al. Enhancement of tumor growth and vascular density by transfection of vascular endothelial cell growth factor into MCF-7 human breast carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:213-129.
226. Staton CA, Chetwood AS, Cameron IC, Cross SS, Brown NJ, Reed MW. The angiogenic switch occurs at the adenoma stage of the adenoma carcinoma sequence in colorectal cancer. *Gut* 2007;56:1426-1432.
227. Cristi E, Perrone G, Toscano G, Verz A , Nori S, Santini D, Tonini G, Vetrani A, Fabiano A, Rabitti C Tumour proliferation, angiogenesis and ploidy status in human colon cancer. *J Clin Pathol* 2005;58:1170-1174.
228. Ellis LM, Takahashi Y, Liu W, Shaheen RM. Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. *Oncologist* 2000;5(1):11-15.
229. Yasui W, Oue N, Aung PP, Matsumura S, Shutoh M, Nakayama M. Molecular pathological prognostic factors of gastric cancer: review. *Gastric Cancer* 2005; 8:86-94.
230. Werther K, Christensen IJ, Brünner N, Nielsen HJ. Soluble vascular endothelial growth factor levels in patients with primary colorectal carcinoma. The Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group. *Eur J Surg Oncol* 2000; 26(7):657-662.
231. Zheng s. Han MY. Xiao ZX, Peng JP, Dong Q. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma *World J Gastroenterol* 2003; 9 (6):1227-1230.
232. Doger the EGFR and VEGF expression predict the prognosis in colon cancer? *Eur Surg Res* 2006; 38(6):540-544.

233. Hafner C, Schmitz G, Meyer S, Bataille F, Hau P, Langmann T, Dietmaier W, Landthaler M, Vogt T Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers. *Clin Chem* 2004; 50(3):490-499.
234. Mao W, Luis E, Ross S, Silva J, Tan C, Crowley C, Chui C, Franz G, Senter P, Koeppen H, Polakis P. EphB2 as a therapeutic antibody drug target for the treatment of colorectal cancer. *Cancer Res* 2004; 64(3):781-788.
235. Lugli A, Spichtin H, Maurer R, Mirlacher M, Kiefer J, Huusko P, Azorsa D, Terracciano L, Sauter G, Kallioniemi OP, Mousses S, Tornillo L. EphB2 expression across 138 human tumor types in a tissue microarray: high levels of expression in gastrointestinal cancers. *Clin Cancer Res* 2005; 11(18):6450-6458.
236. Kullander K, Klein R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:475-486.
237. Kuijper S, Turner CJ, Adams RH. Regulation of angiogenesis by Eph-ephrin interactions. *Trends Cardiovasc Med*. 2007; 17(5):145-151.
238. Murai KK, Pasquale EB. 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J Cell Sci* 2003; 116:2823-2832.
239. Nakamoto M. Eph receptors and ephrins. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32:7-12.
240. Noren NK, Pasquale EB. Eph receptor-ephrin bidirectional signals that target Ras and Rho proteins. *Cell Signal* 2004; 16:655-666.
241. Wu Q, Suo Z, Risberg B, Karlsson MG, Villman K, Nesland JM Expression of Ephb2 and Ephb4 in breast carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2004; 10(1):26-33.
242. Gale NW, Holland SJ, Valenzuela DM, Flenniken A, Pan L, Ryan TE, et al. Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* 1996; 17:9-19.

243. Gale NW, Baluk P, Pan L, et al. Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells. *Dev Biol* 2003; 230:151-160.
244. Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 1998; 93:741-753.
245. Batlle E, Henderson J T, Beghtel H, van den Born M M, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T and Clevers H. B-Catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 2002; 111:251-263.
246. Yu H H, Zisch A H, Dodelet V C, Pasquale E B. Multiple signaling interactions of Abl and Arg kinases with the EphB2 receptor. *Oncogene* 2001; 20:3995-4006.
247. Elowe S, Holland S J, Kulkarni S, Pawson T. Downregulation of the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway by the EphB2 receptor tyrosine kinase is required for ephrin-induced neurite retraction. *Mol Cell Biol* 2001; 21:7429-7441.
248. Bruckner K, Klein R. Signaling by Eph receptors and their ephrin ligands. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8:375-382.
249. Himanen JP, Rajashankar KR, Lackmann M, et al: Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. *Nature* 2001; 414: 933-939.
250. Kalo MS, Pasquale EB: Multiple in vivo tyrosine phosphorylation sites in EphB receptors. *Biochemistry* 1999; 38: 14396-14401.
251. Wybenga-Groot LE, Baskin B, Ong SH, et al: Structural basis for autoinhibition of the Ephb2 receptor tyrosine kinase by the unphosphorylated juxtamembrane region. *Cell* 2001; 106: 745-753.

-
252. O'Leary DD, Wilkinson DG. Eph receptors and ephrins inneural development. *Curr Opin Neurobiol* 1999; 9:65-73.
253. Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, Diella F, Gale NW, Deutsch U, et al. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* 1999; 13:295-306.
254. Pasquale EB. The Eph family of receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9:608–615
255. Cheng N, Brantley DM, Chen J. The ephrins and Eph receptors in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13:75-85.
256. Chinoy MR, Graybill MM, Miller SA, et al: Angiopoietin-1 and VEGF in vascular development and angiogenesis in hypoplastic lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 283: L60-66.
257. Li H, Fredriksson L, Li X, et al: PDGF-D is a potent transforming and angiogenic growth factor. *Oncogene* 2003; 22: 1501-1510.
258. Cromer A, Carles A, Millon R, et al: Identification of genes associated with tumorigenesis and metastatic potential of hypopharyngeal cancer by microarray analysis. *Oncogene* 2004; 23(14):2484-98.
259. Cowan, C. A., and Henkemeyer, M. Ephrins in reverse, park and drive. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 339-346.
260. Wilkinson D. G. Eph receptors and ephrins: regulators of guidance and assembly. *Int Rev Cytol* 2000; 196: 177-244.
261. Dodelet VC, Pasquale EB. Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis. *Oncogene* 2000; 19:5614-5619.

262. Tang XX, Brodeur GM, Campling BG, Ikegaki N. Coexpression of transcripts encoding EPHB receptor protein tyrosine kinases and their ephrin-B ligands in human small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999; 5:455-460.
263. Vogt T, Stolz W, Welsh J, Jung B, Kerbel RS, Kobayashi H, et al. Overexpression of Lerk-5/Eplg5 messenger RNA: a novel marker for increased tumorigenicity and metastatic potential in human malignant melanomas. *Clin Cancer Res* 1998; 4:791-797.
264. Easty DJ, Hill SP, Hsu MY, Fallowfield ME, Florenes VA, Herlyn M, et al. Up-regulation of ephrin-A1 during melanoma progression. *Int J Cancer* 1999; 84:494-501.
265. Kiyokawa E, Takai S, Tanaka M, Iwase T, Suzuki M, Xiang YY, et al. Overexpression of ERK, an EPH family receptor protein tyrosine kinase, in various human tumors. *Cancer Res* 1994; 54:3645-650.
266. Miyazaki T, Kato H, Fukuchi M, Nakajima M, Kuwano H. EphA2 overexpression correlates with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 103:657-663.
267. Liu W, Ahmad SA, Jung YD, Reinmuth N, Fan F, Bucana CD, Ellis LM. Coexpression of ephrin-Bs and their receptors in colon carcinoma *Cancer*. 2002; 94 (4):934-939.
268. Brantley DM, Cheng N, Thompson EJ, Lin Q, Brekken RA, Thorpe PE, et al. Soluble Eph A receptors inhibit tumor angiogenesis and progression in vivo. *Oncogene* 2002; 21:7011-7026
269. Easty DJ, and Bennett DC. Protein tyrosine kinases in malignant melanoma. *Melanoma Res* 2000; 10: 401-411.

270. Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Miyakawa I. Expression of receptor tyrosine kinase EphB4 and its ligand ephrin-B2 is associated with malignant potential in endometrial cancer. *Oncol Rep* 2001; 8: 567-573.
271. Varelias A, Koblar SA, Cowled PA, Carter CD, Clayer M. Human osteosarcoma expresses specific ephrin profiles: implications for tumorigenicity and prognosis. *Cancer* 2002; 95: 862-869.
272. Clevers H, Batlle E. EphB/EphrinB receptors and Wnt signaling in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 2-5.
273. Holmberg J, Genander M, Halford MM, Anneren C, Sondell M. EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche. *Cell* 2006; 125: 1151-1163.
274. Sulman EP, Tang XX, Allen C, Biegel JA, Pleasure DE, Brodeur GM, Ikegaki N: ECK, a human EPH-related gene, maps to 1p36.1, a common region of alteration in human cancers. *Genomics* 1997; 40:371-374.
275. Ikegaki N, Tang XX, Liu XG, et al: Molecular characterization and chromosomal localization of DRT (EPHT3): a developmentally regulated human protein-tyrosine kinase gene of the EPH family. *Hum Mol Genet* 1995;4: 2033-2041.
276. Oba SM, Wang YJ, Song JP, et al: Genomic structure and loss of heterozygosity of EPHB2 in colorectal cancer. *Cancer Lett* 2001; 164: 97-109.
277. Lefeuvre M, Gunduz M, Nagatsuka H, Gunduz E, Al Sheikh Ali M, Beder L, Fukushima K, Yamanaka N, Shimizu K, Nagai N. Fine deletion analysis of 1p36 chromosomal region in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2009; 38(1):94-98.

278. Alazzouzi H, Davalos V, Kokko A, Domingo E, Woerner SM, Wilson AJ, Konrad L, Laiho P, Espin E, Armengol M, Imai K, Yamamoto H, Mariadason JM, Gebert JF, Aaltonen LA, Schwartz SJ, Arango D. Mechanisms of inactivation of the receptor tyrosine kinase EPHB2 in colorectal tumors. *Cancer Res* 2005; 65:10170-10173.
279. Davalos V, Dopeso H, Velho S, Ferreira AM, Cirnes L, Diaz-Chico N, Bilbao C, Ramirez R, Rodriguez G, Falcon O, Leon L, Niessen RC, Keller G, Dallenbach-Hellweg G, Espin E, Armengol M, Plaja A, Perucho M, Imai K, Yamamoto H, Gebert JF, Diaz-Chico JC, Hofstra RM, Woerner SM, Seruca R, Schwartz S Jr, Arango D. High EPHB2 mutation rate in gastric but not endometrial tumors with microsatellite instability. *Oncogene* 2007; 26:308-311.
280. Huusko P, Ponciano-Jackson D, Wolf M, Kiefer JA, Azorsa DO, Tuzmen S, Weaver D, Robbins C, Moses T, Allinen M, Hautaniemi S, Chen Y, Elkahouloun A, Basik M, Bova GS, Bubendorf L, Lugli A, Sauter G, Schleutker J, Ozcelik H, Elowe S, Pawson T, Trent JM, Carpten JD, Kallioniemi OP, Mousses S: Nonsense-mediated decay microarray analysis identifies mutations of EPHB2 in human prostate cancer. *Nat Genet* 2004; 36:979-983.
281. Liu W, Jung YD, Ahmad SA, et al. Effects of overexpression of ephrin-B2 on tumour growth in human colorectal cancer. *BrJCancer* 2004; 90:1620-1626.
282. Kokko A, Laiho P, Lehtonen R, Korja S, Carvajal-Carmona LG, Järvinen H, Mecklin JP, Eng C, Schleutker J, Tomlinson IP, Vahteristo P, Aaltonen LA. EPHB2 germline variants in patients with colorectal cancer or hyperplastic polyposis. *BMC Cancer*. 2006;6:145-151.

-
283. Zogopoulos G, Jorgensen C, Bacani J, Montpetit A, Lepage P, Ferretti V, Chad L, Selvarajah S, Zanke B, Hudson TJ, Pawson T, Gallinger S. Germline EPHB2 receptor variants in familial colorectal cancer. *PLoS One* 2008; 3(8):e2885.
284. Batlle E, Bacani J, Begthel H, Jonkheer S, Gregorieff A, van de Born M, Malats N, Sancho E, Boon E, Pawson T, Gallinger S, Pals S, Clevers H: EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature* 2005; 435:1126-1130.
285. Jubb AM, Zhong F, Bheddah S, Grabsch HI, Frantz GD. EphB2 is a prognostic factor in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11: 5181-5187.
286. Kittles RA, Baffoe-Bonnie AB, Moses TY, Robbins CM, Ahaghotu C, Huusko P, Pettaway C, Vijayakumar S, Bennett J, Hoke G, Mason T, Weinrich S, Trent J, Collins F, Mousses S, Bailey-Wilson J, Furbert- Harris P, Dunston G, Powell I, Carpten JD. A common nonsense mutation in EphB2 is associated with prostate cancer risk in African American men with a positive family history. *J Med Genet* 2006; 43: 507-511.
287. Tang, X. X., Evans, A. E., Zhao, H., Cnaan, A., Brodeur, G. M., and Ikegaki, N. Association among EPHB2, TrkA, and MYCN expression in low-stage neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36: 80-86.
288. Kataoka H, Tanaka M, Kanamori M. Expression profile of EFNB1, EFNB2, two ligands of EPHB2 in human gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128: 343-352.
289. Berclaz G, Karamitopoulou E, Mazzucchelli L. Activation of the receptor protein tyrosine kinase EphB4 in endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma. *Ann Oncol* 2003; 14:220-226.

290. Guo DL, Zhang J, Yuen ST, Tsui WY, Chan AS, Ho C, Ji J, Leung SY, Chen X. Reduced expression of EphB2 that parallels invasion and metastasis in colorectal tumours. *Carcinogenesis* 2006; 27 (3):454-464.
291. Nakada M, Niska JA, Miyamori H, McDonough WS, Wu J, Sato H, Berens ME. The phosphorylation of EphB2 receptor regulates migration and invasion of human glioma cells. *Cancer Res* 2004; 64, 3179-3185.
292. Otchy D, Hyman NH, Simmang C, Anthony T, Buie WD, Cataldo P, Church J, Cohen J, Dentsman F, Ellis CN, Kilkenny JW 3rd, Ko C, Moore R, Orsay C, Place R, Rafferty J, Rakinic J, Savoca P, Tjandra J, Whiteford M. Practice parameters for colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2004; 47(8):1269-1284.
293. Compton CC. Colorectal Carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol* 2003; 16(4):376-388.
294. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ. Prognostic factors in colorectal cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 979-994.
295. Compton CC, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors consensus conference: Colorectal Working Group. *Cancer* 2000; 88: 1739-1757.
296. Mulcahy HE, Skelly MM, Husain A, et al. Long-term outcome following curative surgery for malignant large bowel obstruction. *Br J Surg* 1996; 83: 46-50.
297. Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, Lilja H, Brünner N, Chan DW, Babaian R, Bast RC Jr, Dowell B, Esteva FJ, Haglund C, Harbeck N, Hayes DF, Holten-Andersen M, Klee GG, Lamerz R, Looijenga LH, Molina R, Nielsen HJ, Rittenhouse H, Semjonow A, Shih IeM, Sibley P, Sölétormos G, Stephan C, Sokoll L, Hoffman

- BR, Diamandis EP. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clin Chem* 2008; 54(12):e11-e79.
298. Sobin LH. TNM: principles, history, and relation to other prognostic factors *Cancer* 2001; 91(8):1589-1592.
299. Colorectal cancer staging. *CA Cancer J Clin* 2004; 54(6):362-365. Patient pages.
300. Carolyn C, Compton M.D. Colorectal Carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol* 2003; 16(4):376-388.
301. Jessup JM, McGinnis LS, Steele GD Jr., Menck HR, Winchester DP. The national cancer data base report on colon cancer. *Cancer* 1996; 78:918-926.
302. Newland RC, Dent OF, Lyttle MN, Chapuis PH, Bokey EL. Pathologic determinants of survival associated with colorectal cancer with lymph node metastases. A multivariate analysis of 579 patients. *Cancer* 1994; 73:2076-2082.
303. Compton CC. Updated protocol for the examination of specimens removed from patients with colorectal carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 1016-1025.
304. Halvorsen, TB, Johannesen, E. DNA ploidy, tumor site, and prognosis in colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol* 1990; 25:141-148.
305. Henry J.B. Laboratorio. Marbán. Capítulo 15. 281:303.
306. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Gatter KC, Harris AL. Lactate dehydrogenase 5 expression in operable colorectal cancer: strong association with survival and activated vascular endothelial growth factor pathway-a report of the Tumour Angiogenesis Research Group. *J Clin Oncol* 2006; 24(26):4301-4308.
307. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E: Tumour and Angiogenesis Research Group: Lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 5—Differential

- expression by neoplastic and stromal cells in non-small cell lung cancer and other epithelial malignant tumors. *Tumour Biol* 2003; 24:199-202.
308. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al: Tumor and Angiogenesis Research Group: Pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinase expression in non small cell lung cancer and tumor-associated stroma. *Neoplasia* 2005; 7:1-6
309. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Harris AL, et al: Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: A metabolic survival role of tumor-associated stroma. *Cancer Res* 2006; 66:632-637.
310. Martínez E, Marcos M, Domínguez MA, Arias F, Villafranca E, Dueñas MT. Marcadores tumorales circulantes con valor pronóstico. *Anales Sis San Navarra* 2000; 24 (1): 53-61
311. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E. Tumor and Angiogenesis Research Group: Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer* 2003; 89:877-885.
312. Wallach. Interpretación clínica de las pruebas de laboratorio. 4 Ed. Masson.2003. Capítulo 3. Pág. 81-88.
313. Lin JT, Wang WS, Yen CC, et al: Outcome of colorectal carcinoma in patients under 40 years of age. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20:900-905.
314. Diaz R, Aparicio J, Girones R, Molina J, et al: Analysis of prognostic factors and applicability of Kohne's prognostic groups in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line irinotecan or oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin Colorectal Cancer* 2005; 5:197-202.

315. Macdonald JS. Carcinoembryonic antigen screening: pros and cons. *Semin Oncol* 1999; 26:556-560.
316. Locker GY, Hamilton S, Harris J, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24:5313-5327.
317. Palmqvist R, Engaras B, Lindmark G, Hallmans G, Tavelin B, Nillson O, Hammarström S, Hafström L. Prediagnostic levels of carcinoembryonic antigen and CA 242 in colorectal cancer: a matched case-control study. *Dis Colon Rectum* 2003; 46:1538-1544.
318. Safi F, Roscher R, Bittner R, Beger HG. The clinical relevance of tumor marker CEA, CA 19-9 in regional chemotherapy for hepatic metastases of colorectal carcinoma. *Int J Biol Markers* 1988; 3:101-106
319. Louhimo J, Carpelan-Holmström M, Alfthan H, Stenman UH, Jarvinen HJ, Haglund C. Serum HCG beta, CA 72-4 and CEA are independent prognostic factors in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2002; 101:545-548
320. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* 2003; 39:718-727.
321. Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem* 2001; 47:624-630.
322. Goldstein MJ, Mitchell EP. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest* 2005; 23:338-351.

323. Chapman MA, Buckley D, Henson DB, Armitage NC. Preoperative carcinoembryonic antigen is related to tumour stage and long-term survival in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1998; 78:1346-1349.
324. Morales-Gutiérrez V, Vegh I, Colina F, Gomez-Camara A, Ignacio Landa J, Ballesteros D, Carreira PE, Enríquez-De-Salamanca R. Survival of patients with colorectal carcinoma: possible prognostic value of tisular carbohydrate antigen 19.9 determination. *Cancer* 1999; 86:1675-1681.
325. Reiter W, Stieber P, Reuter C, Nagel D, Lau-Warner U, Lamerz R. Multivariate analysis of the prognostic value of CEA and CA 19-9 serum levels in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2000; 20:5195-5198.
326. Stelzner S, Hellmich G, Koch R, Ludwig K. Factors predicting survival in stage IV colorectal carcinoma patients after palliative treatment: a multivariate analysis. *J Surg Oncol*. 2005; 15:211-217.
327. Takahashi Y, Mai M, Nakazato H. Preoperative CEA and PPD values as prognostic factors for immunochemotherapy using PSK and 5-FU. *Anticancer Res* 2005; 25:1377-1384.
328. Wiratkapun S, Kraemer M, Seow-Choen F, Ho Y-H, Eu KW. High preoperative serum carcinoembryonic antigen predicts metastatic recurrence in potentially curative colonic cancer: results of a five-year study. *Dis Colon Rectum* 2001; 44:231-235.
329. Carpelan-Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Haglund C. CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 2002; 22:2311-2316.

330. Carpelan-Holmstrom M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Jarvinen H, Haglund C. CEA, CA 242, CA 19-9, CA 72-4 and hCGbeta in the diagnosis of recurrent colorectal cancer. *Tumour Biol* 2004; 25:228-234.
331. Macdonald, JS. Carcinoembryonic antigen screening: pros and cons. *Semin Oncol* 1999; 26:556-560.
332. Behbehani AI, Al-Sayer H, Farghaly M, Kanawati N, Mathew A, al-Bader A, van DA. Prognostic significance of CEA and CA 19-9 in colorectal cancer in Kuwait. *Int J Biol Markers* 2000; 15:51-55.
333. Bast RC, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritse h. 2000 up-to-date of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: Clinical Practice Guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001; 6:1865-1878.
334. Ahmed FE. Molecular markers that predict response to colon cancer therapy. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5:353-375.
335. O'Connell MJ, Schaid DJ, Ganju V, Cunningham J, Kovach JS, Thibodeau SN. Current status of adjuvant chemotherapy for colorectal cancer. Can molecular markers play a role in predicting prognosis? *Cancer* 1992; 70:1732-1739.
336. Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, Malkhosyan S, Perucho M. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat Genet* 1994;6:263-281.
337. Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu A-F, Levitt RC, Sistonen PK, et al. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994; 331:213-221.

- 338. Kato M, Ito Y, Kobayashi S, Isono K. Detection of DCC and K-ras gene alterations in colorectal carcinoma tissue as prognostic markers for liver metastatic recurrence. *Cancer* 1996; 77:1729-1735.
- 339. Alexander J, Watanabe T, Wu TT, et al. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol* 2001; 158: 527-535.
- 340. Laurent-Puig P, Olschwang S, Delattre O. Survival and acquired genetic alterations in colorectal cancer. *Gastroenterol* 1992; 102: 1136-1141.
- 341. Cohn KH, Ornstein DL, Wang F. The significance of allelic deletions and aneuploidy in colorectal carcinoma. *Cancer* 1997; 79: 233-244.
- 342. Carethers JM, Hawn JK, Greenson JK, et al. Prognostic significance of allelic loss at chromosome 18q21 for stage II colorectal cancer. *Gastroenterol* 1998; 114: 1188-1195.
- 343. Shibata D, Reale MA, Siverman P, Fearon ER, Steele G, Jessup JM, et al. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1996; 335:1727-1732.
- 344. Troungos C, Valvanis C, Kapranos N, Kittas C. K-ras mutation in Greek patients with poorly and moderately differentiated tumours of the lower intestinal tract. *Anticancer Res* 1997; 17:1399-1404.
- 345. Cerottini JP, Caplin S, Sarage E, Givel JC, Benhattar J. The type of K-ras mutation determines prognosis in colorectal cancer. *Am J Surg* 1998; 175:198-202.
- 346. Finkelstein SD, Sayegh R, Bakker A, Swalsky P. Determination of tumor aggressiveness in colorectal cancer by K-ras-2 analysis. *Arch Surg* 1993; 128:526-532.

-
347. Ahnen DJ, Feigl P, Quan G, Fenoglio-Preiser C, Lovato LC, Bunn PA Jr et al. Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res* 1998; 58: 1149-1458.
348. Kressner U, Bjorheim J, Westring S, Wahlberg SS, Pahlman L, Glimelius B et al. Ki-ras mutations and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1998; 34: 518-521.
349. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 675-684.
350. Winder T, Lenz HJ. Molecular predictive and prognostic markers in colon cancer. *Cancer Treat Rev.* 2010. Jiang Y, Mackley H, Cheng H, Ajani JA. Use of K-Ras as a predictive biomarker for selecting anti-EGF receptor/pathway treatment. *Biomark Med* 2010; 4(4):535-541.
351. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006; 66:3992-3995.
352. Hardingham JE, Butler WJ, Roder D, Dobrovic A, Dymock RB, Sage RE, Roberts-Thomson IC. Somatic mutations, acetylase status, and prognosis in colorectal cancer. *Gut* 1998; 42:669-672.
353. Kaklamanis L, Savage A, Whitehouse R, Doussis-Anagnostopoulou I, Biddolph S, Tsiotos P et al. Bcl-2 protein expression: association with p53 and prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 77: 1864-1869.

-
354. Bosari S, Viale G, Bossi P, Maggioni M, Coggi G, Murray JJ et al. Cytoplasmic accumulation of p53 protein: an independent prognostic indicator in colorectal adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 681-687.
355. Soong R, Grieu F, Robbins P, Dix B, Chen D, Parsons R et al. p53 alterations are associated with improved prognosis in distal colonic carcinomas. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1405-1411.
356. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001; 344: 1196-1206.
357. Allegra CJ, Parr AL, World LE, Mahoney MR, Sargent DJ, Johnston PG et al. Investigation of the prognostic and predictive value of thymidylate synthase, p53 and Ki-67 in patients with locally advanced colon cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1735-1743.
358. Kressner U, Inganas M, Byding S, Blikstad I, Pahlman L, Glimelius B. Prognostic value of p53 genetic changes in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 593-599.
359. Takanishi DMA, Yaremko L, Angriman I, Yaremko ML, Montag A, Westbrook CA. Chromosome 17p allelic loss in colorectal cancer. *Arch Surg* 1995; 130:585-588.
360. Swalsky PA, Bland KI. Prognostic value of TP53 and K-ras-2 mutational analysis in stage III carcinoma of the colon. *Am J Surg* 1996; 171:41-46.
361. Vidaurreta M, Maestro ML, Sanz-Casla MT, Rafael S, Veganzones S, de la Orden V, Cerdán J, Arroyo M, Torres A. Colorectal carcinoma prognosis can be

- predicted by alterations in gene p53 exon 5 and 8. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23:581-586.
362. Díez M, Enríquez JM, Camunas J, González A, Gutiérrez A, Muguerza JM. Prediction of recurrence in B-C stages of colorectal cancer by p53 nuclear overexpression in comparison with standard pathological features. *Eur J Surg Oncol* 1995; 21:635-639.
363. Zeng ZS, Sarkis AS, Zhang ZF, Klimstra DS, Charytonowicz E, Guillem JG. p53 nuclear overexpression: an independent predictor of survival in lymph node-positive colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 1994; 12:2043-2050.
364. Wiggendaad R, Tamminga R, Blok P, Rouse R, Hermans J. The prognostic significance of p53 expression for survival and local control in rectal carcinoma treated with surgery and postoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 41:29-35.
365. Starzynska T, Bromley M, Marlicz K, Roberts SA, Uciniski M, Stern PL. Accumulation of p53 in relation to long-term prognosis in colorectal carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9:183-186.
366. Lim SB, Jeong SY, Lee MR. Prognostic significance of microsatellite instability in sporadic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19:533-537.
367. Guidoboni M, Gafa R, Viel A, Doglioni C. Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic lymphocytes identify colon cancer patients with a favorable prognosis. *Am J Pathol* 2001; 159: 297-304.
368. Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, Schaffer D. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 917-923.

369. Jass JR, Smyrk TC, Stewart SM, Lane MR, Lanspa SJ, Lynch HT. Pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Anticancer Res* 1994; 14:1631-1634.
370. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4368-4380.
371. Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere JF, Benamouzig R, Breau JL, Perret GY. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer Meta-analysis of the literature. *Br J Cancer* 2006; 94(12):1823-1832.
372. Kuramochi H, Hayashi K, Uchida K. Vascular endothelial growth factor messenger RNA expression level is preserved in liver metastases compared with corresponding primary colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:29-33.
373. Zlobec I, Vuong T, Compton CC. The predictive value of APAF-1 in rectal tumors treated with pre-operative high-dose rate brachytherapy. *Cancer* 2006; 106:284-286.
374. Ogata Y, Matono K, Mizobe T, Ishibashi N, Mori S, Akagi Y, Ikeda S, Ozasa H, Murakami H, Shirouzu K. The expression of vascular endothelial growth factor determines the efficacy of post-operative adjuvant chemotherapy using oral fluoropyrimidines in stage II or III colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2006; 15(5):1111-1116.
375. Cortina C, Palomo-Ponce S, Iglesias M, Fernandez-Masip JL, Vivancos A, Whissell G, Huma M, Peiro N, Gallego L, Jonkheer S, Davy A, Lloreta J, Sancho E, Batlle E (2007) EphB-ephrin-B interactions suppress colorectal cancer progression by compartmentalizing tumor cells. *Nat Genet* 39:1376-1383.

376. Oshima T, Akaike M, Yoshihara K, Shiozawa M, Yamamoto N, Sato T, Akihito N, Nagano Y, Fujii S, Kunisaki C, Wada N, Rino Y, Tanaka K, Masuda M, Imada T (2008) Overexpression of EphA4 gene and reduced expression of EphB2 gene correlates with liver metastasis in colorectal cancer. *Int J Oncol* 33:573-577.
377. Jass JR, Sobin LH. *Histological Typing of Intestinal Tumours: World Health Organization*. 2nd ed. New York, NY: Springer-Verlag NY Inc; 1989
378. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol* 1932; 35:323.
379. Grinnell RS. The grading and prognosis of carcinoma of the colon and rectum. *Cancer* 1959; 3:641-652
380. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407:249-257.
381. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001; 19:1207-1225.
382. Yoshiji H, Harris SR, Thorgeirsson UP. Vascular endothelial growth factor is essential for initial but not continued in vivo growth of human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1997; 57: 3924-3928.
383. Gasparini G. Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor in Breast Cancer. *The Oncologist* 2000; 5(1):37-44.
384. Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol.* 1999; 9: 211-220.
385. Toi M, Matsumoto T, Bando H Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol* 2001; (2) 667-673.

-
386. Strizzi L, Catalano A, Vianale G, Orecchia S, Casalini A, Tassi G, Puntoni R, Mutti L, Procopio A. Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor in human malignant mesothelioma. *J Pathol* 2001; 193: 468-475.
387. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:795-803.
388. Aii S, Mori A, Uchida S, Fujimoto K, Shimada Y, Imamura M Implication of vascular endothelial growth factor in the development and metastasis of human cancers. *Hum Cell* 1999; 12(1):25-30.
389. Takahashi Y, Ellis LM, Mai M. The angiogenic switch of human colon cancer occurs simultaneous to initiation of invasion. *Oncol Rep* 2003; 10: 9-13.
390. Kuniyasu H, Yasui W, Shinohara H, Yano S, Ellis LM, Wilson MR, Bucana CD, Rikita T, Tahara E, Fidler IJ. Induction of angiogenesis by hyperplastic colonic mucosa adjacent to colon cancer. *Am J Pathol*, 2000; 157:1523-1535.
391. Guba M, Seeliger H, Kleespies A. Vascular endotelial growth factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19:510-517.
392. Kabbinar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L: Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 60-65.
393. Ishigami SI, Aii S, Furutani M, Niwano M, Harada T, Mizumoto M, Mori A, Onodera H, Imamura M. Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998; 78: 1379-1384.
394. Balasubramanian SP, Brown NJ, Reed MWR. Role of genetic polymorphisms in tumour angiogenesis. *B J Cancer* 2002;87:1057-1065.

-
395. Brogan IJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, Hutchinson IV. Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol* 1999; 60(12):1245-1249.
396. Wu G, Hasenberg T, Magdeburg R, Bo'nninghoff R, Sturm J, Keese M. Association between EGF, TGF- β 1, VEGF gene polymorphism and colorectal cancer. *World J Surg* 2009; 33:124-129.
397. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV. Polymorphisms in vascular endothelial growth factor gene are associated with increased risk of acute rejection in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 260-264.
398. Krippel P, Langsenlehner U, Renner W, Yazdani-Biuki B, Wolf G, Wascher TC, et al. A common 936 C/T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor is associated with decreased breast cancer risk. *Int J Cancer* 2003; 106(4):468-471.
399. Steffensen KD, Waldstrøm M, Brandslund I, Jakobsen A. The relationship of VEGF polymorphisms with serum VEGF levels and progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2010; 117(1):109-116.
400. Lemos FB, Mol WM, Roodnat JJ, Uitterlinden A, Ijzermans JN, Weimar W, Baan CC. The beneficial effects of recipient-derived vascular endothelial growth factor on graft survival after kidney transplantation. *Transplantation* 2005; 79(9):1221-1225.
401. Mohammadi M, Ollier WE, Hutchinson IV. A functional association study of VEGF gene promoter polymorphisms with VEGF expression by stimulated pbm cells. *Hum Immunol* 2003; 64:S125.

-
402. Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Sivridis E. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004; 46(3):293-298.
403. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund S. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* 2003; 34:383-394.
404. Cacev T, Loncar B, Seiwerth S, Spaventi S, Kapitanovic S. Vascular endothelial growth factor polymorphisms -1154 G/A and -460 C/T are not associated with VEGF mRNA expression and susceptibility to sporadic colon cancer. *DNA Cell Biol* 2008; 27(10):569-574.
405. Tzanakis N, Gazouli M, Rallis G, Giannopoulos G, Papaconstantinou I, Theodoropoulos G. Vascular endothelial growth factor polymorphisms in gastric cancer development, prognosis, and survival. *J Surg Oncol* 2006; 94(7):624-630.
406. Yapijakis C, Vairaktaris E, Vassiliou S, Vylliotis A, Nkenke E, Nixon AM. The low VEGF production allele of the +936 C/T polymorphism is strongly associated with increased risk for oral cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133(10):787-791.
407. Eroglu A, Gulec S, Kurtman C, Cam R, Akar N. Vascular endothelial growth factor 936 C/T polymorphism in cancer patients. *Ann Oncol* 2006; 17(9):1467-1468.
408. Lee SJ, Lee SY, Jeon HS, Park SH, Jang JS, Lee GY, Son JW, Kim CH, Lee WK, Kam S, Park RW, Park TI, Kang YM, Kim IS, Jung TH, Park JY. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev* 2005; 14: 571-575.
409. McCarron SL, Edwards S, Evans PR. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Res* 2002; 62:3369-3372.

410. Howell WM, Bateman AC, Tumer SJ. Influence of vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms on tumour development in cutaneous malignant melanoma. *Genes Immun* 2002; 3:229-232.
411. Pasquale EB. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 2008; 133:38-52.
412. Senior PV, Zhang BX, Chan ST. Loss of cell-surface receptor EphB2 is important for the growth, migration, and invasiveness of a colon cancer cell line. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25(6):687-694.
413. Tang XX, Evans AE, Zhao H, et al. High-level expression of EPHB6, EFNB2, and EFNB3 is associated with low tumor stage and high TrkA expression in human neuroblastomas. *Clin Cancer Res* 1999; 5:1491-1496.
414. Clarke AR Wnt signalling in the mouse intestine. *Oncogene* 2006; 25:7512-7521.
415. Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2007; 17:45-51.
416. Wu Q, Suo Z, Kristensen GB, Baekelandt M, Nesland JM. The prognostic impact of EphB2/B4 expression on patients with advanced ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2006; 102(1):15-21.
417. Langsenlehner U, Wolf G, Langsenlehner T, Gerger A, Hofmann G, Clar H, Wascher TC, Paulweber B, Samonigg H, Krippel P, Renner W. Genetic polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and breast cancer risk. The Austrian "tumor of breast tissue: incidence, genetics, and environmental risk factors" study. *Breast Cancer Res Treat* 2008;109(2):297-304.

-
418. Hefler LA, Mustea A, Könsgen D, Concini N, Tanner B, Strick R, Heinze G, Grimm C, Schuster E, Tempfer C, Reinthaller A, Zeillinger R. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13(3):898-901.
419. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, Inoue I, Katayama S. A common polymorphism in the 5' untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 1635-1639.
420. Chae YS, Kim JG, Sohn SK, Cho YY, Ahn BM, Monn JH, Jeon SW, Park JY, Lee IT, Jun S. Association of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms with susceptibility and clinic pathologic characteristics of colorectal cancer. *J Korean Med Sci* 2008; 23: 421-427.
421. Song JH, Kim CJ, Cho YG, Kwak HJ, Nam SW, Yoo NJ, Lee JY, Park WS. Genetic and epigenetic analysis of the EPHB2 gene in gastric cancers. *APMIS*. 2007; 115(2):164-168.
422. Dassoulas K, Gazouli M, Rizos S, Theodoropoulos G, Christoni Z, Nikiteas N, Karakitsos P. Common polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and colorectal cancer development, prognosis, and survival. *Mol Carcinog* 2009; 48(6):563-569.
423. Lu H, Shu XO, Cui Y, Kataoka N, Wen W, Cai Q, Ruan ZX, Gao YT, Zheng W. Association of Genetic Polymorphisms in the VEGF Gene with Breast Cancer Survival. *Cancer Res* 2005; 65(12):5015-5019.

424. Kim JG, Sohn SK, Chae YS et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms associated with prognosis for patients with gastric cancer. *Ann Oncol* 2007; 18: 1030-1036.
425. Lurje G, Zhang W, Schultheis AM, Yang D, Groshen S, Hendifar AE, Husain H, Gordon MA, Nagashima F, Chang HM, Lenz HJ. Polymorphisms in VEGF and IL-8 predict tumor recurrence in stage III colon cancer. *Ann Oncol* 2008; 19: 1734-1741.